Aus den Medizinischen Universitätskliniken
Würzburg Direktor: Prof. Dr. Grafe
Gießen Direktor: Prof. Dr. Bohnenkamp
Freiburg i. Br. Direktor: Prof. Dr. Bohnenkamp.

Untersuchungen über die Fluoreszenz und Phosphoreszenz von Haematoporphyrin und Aetioporphyrin in festen Medien.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
einer hohen medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i. Br.

Vorgelegt von
Emil Josef Klaus
aus Kaiserslautern
1934.

Verlagsdruckerei Bär & Bartosch / Freiburg-Breisgau

Aus den Medizinischen Universitätskliniken

Würzburg Direktor: Prof. Dr. Grafe
Gießen Direktor: Prof. Dr. Bohnenkamp
Freiburg i. Br. Direktor: Prof. Dr. Bohnenkamp.

Untersuchungen über die Fluoreszenz und Phosphoreszenz von Haematoporphyrin und Aetioporphyrin in festen Medien.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
einer hohen medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i. Br.

Vorgelegt von
Emil Josef Klaus
aus Kaiserslautern
1934.

Verlagsdruckerei Bär & Bartosch / Freiburg-Breisgau

Dekan der med. Fakultät: Prof. Dr. Kapfhammer.

Referent: Prof. Dr. Bohnenkamp.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsangabe.

Seite

I. Einleitung 5

II. Photolumineszenz.

1. Jetziger Stand der Lumineszenzforschung 7

2. Die Lumineszenz von Farbstoffphosphoren 9
   a) Phosphore aus organischen Grundstoffen 9
      kristalline Phosphore 9
      glasige Phosphore 9
      Cellulose-Papierphosphore 11
   b) Phosphore aus anorganischem Grundstoff 11
      Borsäurephosphore 11

III. Die Haematoporphyrinlumineszenz.

1. Geschichtlicher Überblick 12

2. Lumineszenz und Absorption 14

3. Erregungsverteilung 17
   a) Fluoreszenz 17
   b) Phosphoreszenz 19

IV. Untersuchung von Porphyrinphosphoren.

1. Herstellung der Phosphore 22

2. Okulare Lumineszenzuntersuchung 26
   a) Versuchsanordnung 26
   b) Die Eigenlumineszenz der Grundstoffe 29
   c) Ergebnisse der Fluoreszenzbeobachtung 29
   d) Ergebnisse der Phosphoreszenzbeobachtung 30

3. Spektrographische Fluoreszenzuntersuchungen 32
   a) Versuchsanordnung 32
   b) Ergebnisse 35
   c) Arbeitshypothese 46

4. Spektrographische Phosphoreszenzuntersuchungen 46

V. Zusammenfassung der Ergebnisse 49

Vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Prof. Dr. H. Bohnenkamp in der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg und Gießen ausgeführt und in Freiburg beendet.

Eine angenehme Pflicht ist es mir, meinem hochverehrten Lehrer auch an dieser Stelle meinen Dank auszusprechen für die Anregung zu dieser Arbeit, für das mir bewiesene Wohlwollen und die mannigfache Unterstützung.

Ebenso bin ich zu Dank verpflichtet Herrn Dr. F. Bandow für die mir erteilten Ratschläge und seine mehrfache Hilfe.

Verschiedene chemische Substanzen wurden mir von dem Direktor des chemisch-physiologischen Instituts Würzburg, Herrn Prof. Dr. D. Ackermann, in besonders reiner Form freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das verwandte Aetioporphyrin verdanke ich der Liebenswürdigkeit des Herrn Geheimrats H. Fischer, München.

Auch der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft ist zu danken, welche Herrn Prof. Dr. Bohnenkamp den bei vorliegenden Untersuchungen benutzten großen Steinheilspektrographen zur Verfügung stellte.

I. Einleitung.

Die Bausteine des Blutfarbstoffes, besonders seine Farbstoffkomponente, haben schon viele Forscher veranlaßt, diese Stoffe zum Gegenstand ihrer Untersuchungen zu machen. Da sowohl beim Haemoglobin, wie auch bei seinen Abkömmlingen, und überhaupt bei dem großen Heer der natürlichen und künstlichen Porphyrine noch vieles ungeklärt ist, ging man diesen Körpern mit recht verschiedenen Untersuchungsmethoden zu Leibe.

Neben rein chemischen Verfahren gründen sich unsere Kenntnisse über den Blutfarbstoff und die Porphyrine zu einem großen Teil auf die spektroskopische Untersuchung, welche sich als eine wichtige und in vielen Fällen sogar ausschlaggebende Untersuchungsmethode erwiesen hat.

Zu den mannigfachen Wegen, die schon gegangen worden sind, um Aufschluß über das Verhalten von biologisch wichtigen Körpern zu bekommen, gehört auch die Untersuchung ihrer Lumineszenzerscheinungen. Über die Fluoreszenz von Porphyrinen liegen eine Reihe von Arbeiten vor. Es handelt sich dabei aber nur um Fluoreszenzuntersuchungen an Porphyrin-Lösungen.

Die Physiker haben uns aber gezeigt, daß man die Lumineszenz von Farbstoffen in verschiedenem Aggregatzustand untersuchen kann, und haben darauf hingewiesen, daß man die momentan abklingende Fluoreszenz durch Einbetten in ein festes oder zähes Grundmaterial in länger dauernde Phosphoreszenz umwandeln kann. Hierbei wurden aber bisher nur körperfremde Stoffe verwandt, z. B. Eosin, Fluoreszëin und ähnliche, wobei als Grundmaterial gewöhnlich Zucker und Gelatine gewählt wurde. Für Stoffe, die besondere Bedeutung für den Organismus haben, liegen nur ganz wenig Beobachtungen vor, die auch nicht systematisch weiter verfolgt worden sind.

Bei dem weit gesteckten Ziel, durch umfassende physikalische, insbesondere optische Verfahren und Beobachtungen das Verhalten der Bausteine des Blutfarbstoffs, besonders der Porphyrine, zu

untersuchen, wurde im Rahmen von Untersuchungen, die Herr Prof. Bohnenkamp mit seinen Mitarbeitern, insbesondere Herrn Dr. Bandow, in Gang setzte,[1] in dieser Arbeit unternommen, zunächst einmal das Haematoporphyrin und zum Teil auch das Aetioporphyrin systematisch auf ihre Fluoreszenz- und Phosphoreszenzfähigkeit in festen Medien zu prüfen.

In dieser Arbeit, die also einen Beitrag zur Frage der optischen Eigenschaften der Porphyrine liefern soll, wurden als Grundmaterialien absichtlich auch solche Stoffe gewählt, welche für den Organismus besondere Bedeutung haben, nämlich Eiweiß und Aminosäuren. Es lag zugleich die Absicht zugrunde, aus der Lumineszenz, die ja auf einer Wechselwirkung zwischen Farbstoff- und Grundstoffmolekülen beruht, etwas über den Baustoff der lebenden Substanz und die Zusammenhänge seiner Spaltprodukte zu erfahren.

[1] F. Bandow, Beitrag zur Kenntnis der Metallkomplexsalze des Haematoporphyrins, Ztschr. f. Physiol. Chem. 223, 71, 1934. — K. S. Frese, Spektrochemische Untersuchungen an Haematoporphyrin und seinen Verbindungen, Diss. Würzburg 1932. — H. Thiele, Quantitative Absorptionsuntersuchungen an Porphyrinen, Diss. Würzburg 1934. — M. Stenger, Absorptionsspektren von Porphyrinen in verschiedenen Säuren, Diss. Freiburg 1935.

II. Photolumineszenz.

1. Jetziger Stand der Lumineszenzforschung.

Photolumineszenz bezeichnet allgemein die Fähigkeit von chemischen Stoffen eingestrahlte Lichtenergie wieder auszustrahlen. Wird die eingestrahlte Energie während der Erregung wieder abgegeben, so spricht man von Fluoreszenz; wird die eingestrahlte Energie aber aufgespeichert und erst allmählich nach Ende der erregenden Einstrahlung wieder abgegeben, so spricht man von Phosphoreszenz.

Stokes (1) hat schon festgestellt, daß die von einer lumineszierenden Substanz ausgesandten Strahlen den einfallenden nicht gleichen. Der lumineszierende Körper wandelt die erregenden Strahlen so um, daß die emittierten Strahlen größere Wellenlängen besitzen, ein Verhalten, das als Stokes'sche Regel bezeichnet wird.

E. Becquerel (2), der die Gesetze der Lichtemission zu ergründen versuchte, ging von dem Gedanken aus, daß sehr kurz dauernde Phosphoreszenz nur beobachtet werden kann, wenn der zu untersuchende Körper möglichst schnell nach der Belichtung vor das Auge des im Dunkeln befindlichen Beobachters gelangt. Diesem Zweck sollte das von ihm konstruierte Phosphoroskop dienen. Mit diesem Gerät wurden in der Folgezeit eine ganze Menge neuer Phosphore entdeckt. Becquerel war auch der erste, der sich nicht mit der einfachen okularen Beobachtung begnügte, sondern das ausgesandte Licht auch spektroskopisch untersuchte.

An Flüssigkeiten wurde bisher nur Fluoreszenz und keine Phosphoreszenz beobachtet. Die Phosphoreszenzfähigkeit ist an den festen Aggregatzustand gebunden. E. Wiedemann (3) versuchte einen fluoreszierenden Körper (Flüssigkeit) in einen phosphoreszierenden (festen Körper) überzuführen durch Beschränkung der freien Beweglichkeit der Moleküle, da er das rasche Abklingen der Fluoreszenz auf die Zusammenstöße und gegenseitige Beeinflussung der Moleküle zurückführte. Von dieser Auffassung ausgehend versuchte er die Fluoreszenz von Lösungen durch Beimengung von

kolloidalen Stoffen in Phosphoreszenz zu verwandeln. Dies gelang ihm zum Beispiel durch Zugabe von Gelatine zu Eosinlösungen; nach dem Eintrocknen zeigte sich Phosphoreszenzfähigkeit.

G. C. Schmidt (4) versetzte eine Reihe von festen organischen Substanzen mit Anilinfarbstoff und beobachtete diese Körper im Phosphoroskop. Er stellte auch schon fest, daß ein Teil dieser Grundmaterialien eine Eigenlumineszenz besitzt, z. B. Gelatine, Zucker und andere. Bei solchen lumineszierenden Farbstoffen in festen Gelatine- oder Zuckerschichten wird die praktisch momentan abklingende Fluoreszenz, deren Abklingungsdauer nach Wood (5) sicher $< 10^{-6}$ sec. beträgt, in längerdauernde Phosphoreszenz umgewandelt.

Das gleiche gilt bei starker Abkühlung nichtwässriger fluoreszierender Lösungen mit flüssiger Luft. J. Dewar (6) fand bei einer Anzahl von organischen Stoffen, welche bei gewöhnlicher Temperatur nicht oder nur schwach phosphoreszierten, daß mehr oder weniger starke Phosphoreszenz auftrat, wenn man sie bei Temperaturen von —180 bis —200 ° C belichtete. v. Kowalski (7) untersuchte die Lumineszenz erstarrter alkoholischer Lösungen eingehend.

Die gleiche Wirkung läßt sich auch erreichen, wenn man die Stoffe in geschmolzene Borsäure einbettet, wie Tiede (8) gezeigt hat.

Die in einem Lösungsmittel für eine bestimmte Substanz erhobenen Befunde gelten nur für das betreffende Lösungsmittel. In einem anderen Grundmaterial kann das Lumineszenzlicht ein anderes sein. Dieser Vorgang wird nach Kauffmann (9) als Fluoreszenzwechsel bezeichnet.

Das Verhältnis der ausstrahlenden Fluoreszenzenergie zur absorbierten Energie nennt man die Fluoreszenzausbeute. Die Fluoreszenz eines Körpers kann durch beigemengte Stoffe stark beeinträchtigt werden. Absorbiert eine beigemengte Substanz in dem Spektralbereich, welcher die Fluoreszenz erregt, so verbleibt dem fluoreszenzfähigen Körper weniger Energie zur Umwandlung in Fluoreszenzlicht. Bei einer stark absorbierenden Beimengung genügen schon geringe Mengen, um die Fluoreszenz auszulöschen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Fluoreszenzauslöschung. Ein besonderer Fall ist die Auslöschung durch große Konzentrationen des fluoreszierenden Stoffes. Es ist schon lange bekannt, daß bei sehr großen Konzentrationen die Fluoreszenzausbeute abnimmt. Untersuchungen hierüber wurden von Perrin (10) und Wawilow (11) an Farbstofflösungen ausgeführt. In festen Lösungen untersuchte Lewschin (12) die Fluoreszenzauslöschung an durchsichtigen, glasartigen Zuckerphosphoren. Die genannten Autoren stellten auch Theorien über die auslöschende Wechselwirkung der Farbstoffmoleküle auf. Banow (13), welcher

die Fluoreszenzauslöschung von Farbstofflösungen durch Elektrolyte untersuchte, kommt zu dem Ergebnis, daß die Theorie der Stöße zweiter Art (Induktionsphänomen) die Fluoreszenzauslöschung nur ungenügend erklärt und nimmt für diese Erscheinung eine „aussalzende Wirkung" als Ursache an.

Mit den Erscheinungen der Fluoreszenz und Phosphoreszenz beschäftigten sich seit Jahren nicht nur die Physiker, sondern auch die Chemiker, da man feststellte, daß zwischen Lumineszenz einerseits und dem Bau der Moleküle andererseits Beziehungen bestehen. Arbeiten über Lumineszenz organischer Verbindungen sind von großem Interesse für chemische Konstitutionsfragen, es läßt sich daraus auf die Anwesenheit bestimmter fluorophorer Gruppen im Molekül schließen. J. Stark (14) nahm als kennzeichnendes Merkmal für das Zustandekommen der Fluoreszenz an, daß der maßgebende Molekülteil in einem geschlossenen Ring enthalten sein müsse. Bei nicht geschlossenem Ring sei der Chromophor bezw. Fluorophor gegen Störungen ungenügend gesichert und die aufgenommene Lichtenergie könnte nicht wieder als Licht ausgestrahlt werden.

Durch die Entdeckung der Ultraviolettfluoreszenz zahlreicher organischer Verbindungen, auf die Stark hingewiesen hat, wurde das Untersuchungsmaterial außerordentlich bereichert.

2. Die Farbstoffphosphore.

Aus dem Vorigen geht hervor, daß man bei der Lumineszenz organischer Phosphore unterscheiden muß zwischen der Lumineszenz reiner organischer Stoffe und organischer Stoffe, die in ein Grundmaterial eingebettet sind, welches organisch oder anorganisch sein kann. Bei unseren Haematophorphyrinphosphoren haben wir es mit der letzteren Gruppe zu tun, es sind „Fremdstoffphosphore". Wir teilen diese Phosphore nach dem Einbettungsstoff in verschiedene Unterabteilungen ein.

a) Phosphore aus organischen Grundstoffen.

Als Einbettungsmaterial werden kristallisierte organische Substanzen benutzt, z. B. Benzoesäure, Phthalsäure u. a. Damit diese Phosphore lumineszieren, muß der Leuchtstoff das Grundmaterial innig durchdringen, vielleicht sogar in das Kristallgitter eintreten. Einfache Adsorption des Farbstoffs liefert keine Phosphore, wie G. C. Schmidt (15) für Eosin an Benzoesäure gezeigt hat.

Schöne Farbstoffphosphore erhält man auch durch Einbetten der Leuchtstoffe in glasiges Grundmaterial, meist kolloidale Substanzen wie Gelatine, Kollodium, Eiweiß u. a. Besonders gute Phosphore liefert geschmolzener Zucker, der nach dem Erstarren kräftig

lumineszieren. Gelatine-, Kollodium- und Zuckerphosphore sind von einer ganzen Reihe von Forschern näher untersucht worden [P. Pringsheim (16), S. J. Wawilow (11), W. L. Lewschin (12)], besonders, da diese Phosphore im Gegensatz zu anderen bei Erregung mit polarisiertem Licht wieder polarisiertes Licht aussenden. Man nimmt an, daß die zur Lumineszenzfähigkeit nötige Störungsfreiheit des Chromophors hier nicht nur durch den Bau des Moleküls, sondern auch durch die Bindung des Moleküls in einem festen Medium bedingt ist, da in diesen Grundmaterialien auch Farbstoffe zur Lumineszenz erregt werden können, die in wässeriger oder alkoholischer Lösung nicht fluoreszieren, z. B. Purpurin, Malachitgrün. Durch die Verfestigung des Lösungsmittels kann also nicht nur die Aufspeicherung, sondern auch die ungestörte Emission des Lumineszenzlichtes bewirkt werden.

Auf den Einfluß der Zähigkeit der Lösungsmittel auf die Lichtemission haben Carelli und Pringsheim (17) sowie Perrin (10) hingewiesen. Auch bei der Untersuchung der Polarisation des Lumineszenzlichtes dieser Phosphore wurde ein Einfluß der Viscosität festgestellt. Auf Grund solcher Beobachtungen versuchten Wawilow und Lewschin (11) Unterschiede zwischen „echter" und „scheinbarer" Zähigkeit festzulegen. Zu den echt-zähen Medien gehören nach ihnen z. B. Gelatine und Zuckersirup. In diesen Stoffen ist der Polarisationsgrad hoch, während (noch nicht vollkommen erstarrtes und eingetrocknetes) Kollodium nur scheinbar zäh ist und keinen anderen Polarisationsgrad zeigt, als wenn die betreffenden Farbstoffe in Aether oder Alkohol gelöst sind. Carelli und Pringsheim (17) bestätigen diese Beobachtungen, erklären sie aber damit, daß bei diesem Kollodium die fluoreszierenden Farbstoffe nur im Alkohol-Aethergemisch gelöst sind, während die Nitrozellulose noch nicht angefärbt ist. Erst wenn die Lösung durch Verdunsten des Aethers zu einer vollkommen festen Schicht erstarrt, geht der Farbstoff in die Nitrozellulose hinein und befindet sich nunmehr anscheinend in einer festen Lösung.

Trotz der großen Bedeutung der Zähigkeit des Lösungsmittels ist andererseits seine molekulare Struktur von entscheidendem Einfluß, da in Gelatine und Eiweiß gut nachleuchtende Stoffe in Wasserglas und Kollodium trotz der Härte dieser Einbettungsmittel nur ganz kurzes Nachleuchten aufweisen. Diese Feststellung können wir nach unseren Versuchen auch auf Haematoporphyrin in diesen Grundmaterialien ausdehnen, da wir in Gelatine und Eiweiß sehr gute Hp.-Phosphoreszenz erhielten, in Kollodium dagegen überhaupt kein Nachleuchten des Haematoporphyrins beobachten konnten.

Kautsky (18) kommt durch den Unterschied zwischen den festen und den noch nicht vollkommen erstarrten Phosphoren zu folgender Erklärung ihrer Lumineszenz: die hochpolymeren Stoffe Eiweiß,

Gelatine, Cellulose, die als reversibel quellbare Gele und gleichzeitig als oxydierbare organische Verbindungen anzusehen sind, haben Grenzflächen, an welche die Farbstoffe in wässeriger Lösung adsorbiert werden. Kautsky, der seine Untersuchungen an Zellulosepapieren machte, nimmt bei diesen Phosphoren als Grenzflächen die der kleinen Kristallite an, welche mit der Röntgenanalyse nachweisbar sind. In völlig entquollenem Zustand sind die Grenzflächen, an denen die Farbstoffmoleküle bei der Quellung adsorbiert werden, einer äußeren Einwirkung entzogen, was auch daraus geschlossen wird, daß das Nachleuchten dieser Phosphore durch Sauerstoff nicht mehr beeinträchtigt wird.

Zur Lumineszenz in glasigem Grundmaterial rechnet man auch die sogenannten Lösungsphosphore. Sie entstehen durch Einbettung von organischen Stoffen in Alkohol oder in zahlreiche aromatische Lösungsmittel, die durch Einwirkung tiefer Temperatur erstarrt sind. Diese von Borrisow (19), v. Kowalski (7) und Goldstein (20) untersuchten Lösungsphosphore seien nur kurz erwähnt, da wir keine derartigen Porphyrinphosphore untersuchten.

b) Phosphore aus anorganischem Grundstoff.

Hier sind die Borsäurephosphore zu nennen, die von Tiede (8) und seinen Mitarbeitern eingehend untersucht worden sind. Sie gehören zu den hellsten bis jetzt dargestellten Phosphoren. Mehr oder weniger entwässerte Borsäure (zwischen $B[OH]_3$ bis B_2O_3) bildet das Grundmaterial, in welches die organische Substanz eingebettet wird. Die Borsäurephosphore unterscheiden sich von den bis jetzt genannten dadurch, daß bei ihnen charakteristische, besonders stark unterteilte Spektren auftreten. Tiede und Schleede (21) vertreten die Ansicht, daß das Auftreten der kennzeichnenden Spektren dieser Phosphore durch die starke Kontraktion des Lösungsmittels und die daraus sich ergebende Deformation der Moleküle hervorgerufen wird.

Aus diesen Betrachtungen geht hervor, daß die Bedingungen für das Zustandekommen der Lumineszenz in festen Medien für die einzelnen Grundmaterialien verschieden sind. Von diesem Gesichtspunkt aus haben wir die Porphyrinlumineszenz in verschiedenen Grundstoffen untersucht und alle wichtigen Phosphore außer den Lösungsphosphoren berücksichtigt. Als kristallinische Medien wählten wir eine Reihe von Aminosäuren, als glasige Grundstoffe Gelatine, Eiweiß, Kollodium, Zucker u. a. Außerdem kamen Papierphosphore und die erst in jüngster Zeit entdeckten Borsäurephosphore zur Untersuchung.

III. Die Porphyrinlumineszenz.

1. Geschichtlicher Überblick.

Die das Haematoporphyrin vor allen anderen Blutfarbstoffderivaten auszeichnende Eigenschaft der Fluoreszenz wurde von F. Hoppe-Seyler (22) im Jahre 1880 entdeckt. In seiner Arbeit über das Chlorophyllderivat Phylloporphyrin sagt er: „Auch in ihrem fluoreszierenden Licht, das ich früher beim Haematoporphyrin außer acht gelassen hatte, zeigt sich große Ähnlichkeit". Über die Fluoreszenz des Haematoporphyrins in verschiedenen Lösungsmitteln berichtet 1896 Schunk und Marchlewski (23): „Es ergab sich, daß die Lösungen des Haematoporphyrins in neutralen Lösungsmitteln wie Alkohol und Aether genau dieselbe Farbe und Fluoreszenz besitzen wie die des Phylloporphyrins". In seiner Untersuchung über die sensibilisierende Wirkung des Haematoporphyrins behandelt Hausmann (24) 1911 seine Fluoreszenz in sauren und alkalischen Lösungen. Im gleichen Jahre erschien die auch hierher gehörige eingehende Arbeit von Dhéré und Sobolewski (25).

Die Fluoreszenzprobe zum Nachweis von Haematoporphyrin im Harn benutzte als erster Hausmann 1913 (24). Der Farbenunterschied der Haematoporphyrinfluoreszenz in saurer und alkalischer Lösung, auf den Dhéré hingewiesen hat, wurde später von Heller (26) und Golonsko (27) für Blutspurenuntersuchungen in der gerichtlichen Medizin ausgewertet. Heller hebt auch schon hervor, daß die Anwendung der Fluoreszenzmethode als diagnostisches Hilfsmittel bei Krankheiten und Vergiftungen, die mit Ausscheidung von Porphyrin durch den Harn einhergehen, in Frage käme. Langecker (28) versuchte festzustellen, wie weit sich die Fluoreszenz zum Nachweis des Haematoporphyrins im Harn und Serum verwerten läßt, und findet, daß die Fluoreszenz in Lösungen von 5×10^{-8} molar noch zu beobachten ist, während die Absorptionsstreifen bei 60 mm dicker Schicht nur noch in Lösungen von 1×10^{-5} molar nachgewiesen werden können.

J. Enneking (29) stellte vergleichende quantitative Fluoreszenzuntersuchungen mittels colorimetrischer, nephelometrischer und photometrischer Meßmethoden an und kam zu dem Ergebnis, daß die fluoro-tyndallometrische Methode sich am besten zu quantitativen Porphyrinuntersuchungen eignet. Er weist darauf hin, daß die Methode aber nur in dem Konzentrationsbereich von 0,01—0,001 g im Liter durchführbar ist und daß die Messung höherer Konzentrationen an der Oberflächenfluoreszenz und die niedrigerer Konzentrationen an der Lichtschwachheit scheitert.

Ausgehend von der Tatsache, daß es bei den physiologischen und klinischen Untersuchungen gilt, minimale Porphyrinmengen zu bestimmen, hat R. Fikentscher (30) 1932 ein quantitatives Verfahren ausgearbeitet, mit dem durch Lumineszenzintensitätsmessung kleinste Porphyrinmengen nachgewiesen werden können. Als erregende Lichtquelle diente eine Analysenquarzlampe mit Schwarz-Uviolfilter, für die Messung der Fluoreszenzintensität wurde das Pulfrich-Photometer der Firma Zeiß verwendet. Fikentscher hält die Bestimmung solch kleiner Farbstoffmengen mit der Absorptionsspektroskopie nicht für zweckmäßig und weist auf die voneinander abweichenden Ergebnisse hin, die O. Schumm (35) einerseits und H. Th. Schreus und Carrié (33) andererseits beim Nachweis des Porphyrins im Harn durch seine Lichtabsorption erhielten. Da wir in der Fluorometrie ein Verfahren haben, Porphyrin in allergeringster Konzentration nachzuweisen, eignet sie sich sehr gut für klinische Untersuchungen, worauf auch Hijmans van d. Bergh (34) und H. Kämmerer (32) hingewiesen haben.

H. Fink (31) hat zum qualitativen Nachweis der Porphyrine ebenfalls von der Fluorometrie Gebrauch gemacht. Er hat vergleichende relative Messungen der Fluoreszenzstärke der einzelnen Porphyrine bei verschiedenem PH vorgenommen. Die Fluoreszenzstärke ist von der Wasserstoffionenkonzentration in charakteristischer Weise abhängig, und Fink konnte auf Grund dieser Untersuchungen für die einzelnen Porphyrine „PH-Fluoreszenzkurven" aufstellen.

Dhéré (25) und seine Mitarbeiter veröffentlichten 1924 einen Bericht über das spektrale Verhalten des Haematoporphyrin Nencki in Lösungen, worin die Fluoreszenzspektren in 3 Typen eingeteilt werden. 1926 hat Dhéré (25) die Fluoreszenzspektren natürlicher und künstlicher Porphyrine verglichen.

Van der Bom (36) hat im Institut von Dhéré außer der Haematoporphyrinfluoreszenz in verschiedenen Lösungsmitteln auch die Fluoreszenz einiger Porphyrin-Metallverbindungen spektrographisch aufgenommen. Im Gegensatz zu van der Bom behauptet Hellström (37), daß die Haematoporphyrin-Metallkomplexverbindungen nicht fluoreszieren und führt abweichende Beobachtungen auf Reste von un-

verändertem Porphyrin zurück, da er in sehr dicker Schicht den entsprechenden Absorptionsstreifen beobachten konnte. Van der Bom, der die Fluoreszenzspektren von Haematoporphyrin auch visuell untersuchte, machte darauf aufmerksam, daß die okular beobachteten und die spektrographisch ermittelten Spektren nicht identisch sind, wegen der verschiedenen Lichtempfindlichkeit von Auge und photographischer Platte und wegen der Verschiedenheit der benutzten Spaltbreite.

E. Bois (38) (1927) hat eine eingehende Beschreibung der spektrographisch untersuchten Fluoreszenz zahlreicher tierischer Porphyrine gegeben.

Zum Aufsuchen der Porphyrine im tierischen Organismus haben Derrien und Turchini (39) in ausgedehntem Maße die Lumineszenzanalyse verbunden mit spektraler Untersuchung angewandt. Diese Autoren weisen auch darauf hin, daß man nicht jede rote Fluoreszenz auf Porphyrin beziehen darf, die spektroskopische Untersuchung muß immer entscheiden. Borst und Königsdörffer (40) (1929) machten bei der Untersuchung der Organe eines durch eine Reihe von wissenschaftlichen Veröffentlichungen bekannten Kranken mit kongenitaler Porphyrie (Petry) ausgiebig von der Lumineszenzanalyse und besonders von der Fluoreszenzmikroanalyse Gebrauch.

Rafalowski (41) hat 1931 nachgewiesen, daß im Fluoreszenzspektrum von Haematoporphyrinlösungen Veränderungen durch Oxydation des Farbstoffes hervorgerufen werden.

2. Absorption und Lumineszenz.

Absorptions- und Emissionsbanden stehen in einem Verhältnis zueinander, das durch die Stokes'sche Regel ausgedrückt wird. Die Erregung ist kürzerwellig als die Emission, doch scheinen auch Überlagerungen und kleine Überschreitungen vorzukommen. Aber auch in den weitestgehenden Fällen des Ineinandergreifens von Erregungsverteilung und Emissionsbande ist doch das Maximum der Emissionsbande stets längerwellig als das Maximum der längstwelligen Erregungsbande.

Über die Absorptionsspektren von Porphyrinen liegt schon eine große Zahl von Untersuchungen vor. Auch van der Bom, der die Haematoporphyrinfluoreszenz von Lösungen untersuchte, hat vor der Aufnahme der Fluoreszenzspektren die Absorption aufgenommen, bei einer Schichtdicke, welche die Absorptionsbande in nächster Nähe der Fluoreszenzbande besonders scharf hervortreten läßt.

Bei der Fluoreszenz von Lösungen und festen Stoffen besteht die Erregungsverteilung aus verwaschenen, begrenzten Absorptionsgebieten. Das Absorptionsspektrum des Haematoporphyrins in Lö-

sung ist abhängig vom Lösungsmittel. Man unterscheidet verschiedene Spektraltypen. Das sogenannte neutrale Spektrum, welches sich bei Porphyrin in Substanz, in alkalischer und neutraler Lösung findet, zeigt (in erster Näherung) vier Banden, das saure Spektrum drei Banden in charakteristischer Anordnung. Außerdem gibt es noch einen Zwischentyp, der nach Treibs (42) zustandekommt, wenn in saurer Lösung das Haematoporphyrin statt mit zwei mit nur einem Molekül Säure zusammenwirkt. Die Lage der Absorptionsbanden ist außerdem von der Temperatur abhängig, wie H. Fischer (43), Hellström (37) und K. S. Frese (44) gezeigt haben.[2]

Unsere zur Herstellung der Farbstoffphosphore benutzte Haematoporphyrin-Lösung (Nordmark, PH 7,9) zeigte das neutrale Absorptionsspektrum, das wir mit dem Gitterspektroskop nach Loewe-Schumm der Firma Zeiß wie folgt feststellten:[3]

6245—6040, 5780—5680, 5440—5315, 5255—4845.

Bei der spektrographischen Ermittlung der Absorptionsspektren unserer Haematoporphyrin-Phosphore legten wir keinen Wert auf Vollständigkeit der Aufnahmereihen. Wir stellten nur von einigen wichtigen Vertretern die Lage der Absorptionsbanden fest. Es sollte vor allem die Frage geklärt werden, ob bei den Fluoreszenzaufnahmen unserer Farbstoffphosphore in Durchsicht (vergl. Abschnitt IV 3a) die Lücken in den Fluoreszenzspektren durch Absorptionsbanden vorgetäuscht sein könnten. Daß dies nicht der Fall ist, zeigt sich aus der Lage der Haematoporphyrin-Absorptionsbanden folgender Phosphore (siehe Fig. 1):

Traubenzucker:	5950—5890, 5620—5410.
Arabinose:	5980—5920, 5680—5410.
Glykogen:	5980—5920, 5780—5710, 5590—5430.
Gelatine:	6310—6210, 5780—5650.
Borsäure:	6120—6020, 5680—5540.

Aus der Lage der in Figur 1 angegebenen Absorptions- und Fluoreszenzbanden ist ersichtlich, daß die Fluoreszenz durch die Absorption zum Teil geschwächt wird, was natürlich bei Fluoreszenzaufnahmen in Durchsicht mehr zur Geltung kommt. Es sei noch darauf aufmerksam gemacht, daß nach der Lage der Banden und ihrer Intensitätsverteilung die Absorptionsspektren der Saccharide, soweit dies unsere bisherigen Aufnahmen beurteilen lassen, den sauren Typ zeigen, Gelatine aber den neutralen Typ, wie er von Lösungen her bekannt ist. Wir werden diesen Befund an späterer Stelle noch verwenden (IV 3c).

---

[2] Hierher gehören auch die Untersuchungen von Frl. Stenger, vergl. Seite 6.
[3] Die Wellenlängen geben wir in Angstroem-Einheiten an.

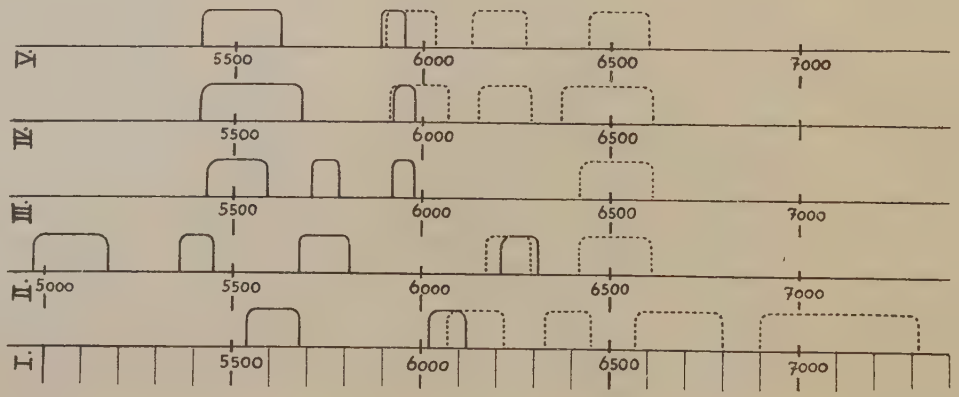


Fig. 1

Die Lage von Absorptions- und Fluoreszenzbanden einiger Haematoporphyrin-phosphore mit verschiedenem Grundmaterial.

——— = Absorptionsbanden, ····· = Fluoreszenzbanden.

I. Borsäure, II. Gelatine, III. Glykogen, IV. Arabinose, V. Glukose.

Die Versuchsanordnung war bei unsern Absorptionsaufnahmen folgende: Es wurde der Glasspektrograph GH der Firma Steinheil mit drei Prismen verwendet. Die Spaltweite war 0,1 mm; als Lichtquelle diente eine Punktlampe (Osram) mit Kondensor. Die Phosphore wurden dicht vor dem Spalt angebracht und zwar, soweit es das Grundmaterial zuließ, ohne Unterlage, z. B. Gelatine; Traubenzucker, Arabinose und Glykogen dagegen auf einem 0,2 mm dicken Deckgläschen. Die Phosphore wurden so befestigt, daß ihre lumineszierende Schicht der Punktlampe zugekehrt war. Es wurden immer mehrere Aufnahmen mit verschiedenen Belichtungszeiten gemacht. Als Vergleichsspektrum diente das Spektrum von Helium im Geißlerrohr. Als Negativmaterial wurden Agfa-Superpanplatten verwendet.

An zwei Haematoporphyrin-Gelatinephosphoren wurde außerdem die Durchlässigkeit mit dem Spektralphotometer nach König-Martens (der Firma Schmidt & Haensch) gemessen. Es zeigte sich wieder, daß durch die Absorption keine Fluoreszenzbanden vorgetäuscht sein können.

3. Erregungsverteilung.

a) Fluoreszenz.

Von besonderer Bedeutung erschien uns die Feststellung der Erregungsverteilung sowohl des Momentanleuchtens als auch des Nachleuchtens unserer Haematoporphyrinphosphore, d. h. die Ermittlung derjenigen Wellenlängengebiete, die vorzugsweise die Fluoreszenz- bezw. die Phosphoreszenz von Haematoporphyrin in festen Medien zu erregen imstande sind.

Zur Frage der Erregungsverteilung der Haematoporphyrin-Fluoreszenz in Lösungen finden sich in der Literatur eine Reihe von Angaben. Nach Dhéré sind die Strahlen zwischen 4100 und 3800 die zur Erregung wirksamsten. Dhéré und Sobolewski (25) haben schon 1911 darauf aufmerksam gemacht, daß die rote Haematoporphyrin-Fluoreszenz durch ausschließlich ultraviolette Strahlen (etwa 3750—3000) hervorgerufen werden kann, eine Feststellung, die man dann bei sämtlichen anderen Porphyrinen machte, die nach dieser Richtung hin untersucht wurden. Daß der langwellige Teil des UV., in dem ein Hauptabsorptionsbereich des Haematoporphyrins liegt, kräftige Fluoreszenz erregt, geht aus den zahlreichen Spektrogrammen der 1927 erschienenen Arbeit von E. Bois (38) hervor. Van der Bom hat nachgewiesen, daß auch durch sichtbare Strahlen allein, unter völligem Ausschluß des UV. sehr starke Haematoporphyrin-Fluoreszenz hervorgerufen werden kann. Van der Bom, welcher seine Untersuchungen mit einer Kohlenbogenlampe von 20 Amp. machte, hat auch angegeben, daß die sichtbaren Strahlen dieser Lichtquelle stärkere Haematoporphyrin-Fluoreszenz erregen

als ihre UV.-Strahlen allein. Dhéré (53) hat die Frage der Erregungsverteilung der Haematoporphyrin-Fluoreszenz auch mit monochromatischem Licht untersucht. Er fand z. B., daß die grüne Quecksilberlinie 5461, sorgfältig isoliert durch kombinierte Filter, nur schwache Porphyrinfluoreszenz erregt, die aber noch die Aufnahme des Spektrogramms in zwei- bis dreitägiger Belichtung gestattete.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse über die Erregungsverteilung der Haematoporphyrin-Fluoreszenz wurden an wässerigen und alkoholischen Lösungen gemacht. Auch ist in den bisherigen Untersuchungen in dieser Richtung nicht der Einfluß des Lösungsmittels auf die Erregungsverteilung untersucht worden. Beobachtungen über die Erregungsverteilung des Momentanleuchtens von Haematoporphyrin in festen Medien liegen nicht vor, auch wir haben noch keine quantitativen Untersuchungen zu dieser Frage angestellt. Beim Vergleich von Quecksilber- und Bogenlampe ist der außerordentlich große Einfluß der Flächenhelligkeit zu beachten. Mit der Lumineszenzbogenlampe der Fa. Leitz-Wetzlar erhielten wir größere Fluoreszenzintensität als mit einem normalen großen Quecksilber-Quarzbrenner der Fa. Heräus-Hanau, während die in Kap. IV 2a beschriebene Bogenlampe von geringerer Stromdichte ungünstiger war.[4] Wieweit neben der Leuchtdichte Verschiedenheiten in der Intensitätsverteilung des Spektrums der erregenden Lichtquellen eine Rolle spielen, kann nach den bisherigen Versuchen noch nicht beurteilt werden.

Weiterhin haben wir mit einer von G. Heyne und M. Pirani (45) angegebenen spektrographischen Methode[5] festgestellt, daß die Hg.-Linien von 5461 Å an bis 2893 das in Glykogen eingebettete Haematopophyrin zu kräftiger Fluoreszenz erregten. Die Versuchsanordnung war dabei folgende: In die Kassette eines Steinheilspektrographen mit Quarzoptik wurde statt der photographischen Platte ein Superpanfilm eingelegt und dicht davor eine Glasplatte, welche mit einer dünnen, durchscheinenden, möglichst gleichmäßigen Haematoporphyrin-Glykogenschicht versehen war, so angebracht, daß die Lumineszenzschicht dem Prisma des Spektrographen zugekehrt war. Zwischen Glasplatte und Film wurde ein rotgelbes Gelatinefilter (Nr. 9 der folgenden Tabelle) eingelegt, um die Eigenfluoreszenz des Grundmaterials zu absorbieren. Das durch den Quarzspektrographen entworfene Hg.-Linienspektrum gibt durch das Filter hindurch nicht an. Fällt aber das Spektrum auf die fluores-

[4] Über eine Quecksilberdampflampe mit besonders hoher Leuchtdichte vergl. Dhéré (53) S. 3115.

[5] Dieses Verfahren wurde für Flüssigkeiten schon von Henri (46) angewandt und bringt gegenüber der sonst üblichen Festlegung der Erregungsverteilung (Lenard u. a.) nur die Verwendung der photographischen Platte.

zierende, durchscheinende haematoporphyrinhaltige Glykogenschicht. so rufen die Stellen der Lumineszenzschicht, die von den erregenden Strahlen (untersuchter Bereich 5461—2893) getroffen werden, eine photographische Wirkung hervor, da das nunmehr entstandene langwellige Haematoporphyrinfluoreszenzlicht das Filter durchdringen kann.

b) Phosphoreszenz.

Während über die Erregungsverteilung der Haematoporphyrinfluoreszenz schon experimentelle Ergebnisse vorlagen, fanden wir im Schrifttum über die Erregungsverteilung der Haematoporphyrinphosphoreszenz keine Angaben.

Daß zwischen beiden ein grundlegender Unterschied sein muß. wurde uns klar, nachdem es trotz längere Zeit hindurch fortgeführter Versuche mit der Quecksilberdampflampe nicht gelungen war. okular oder spektrographisch (auch nicht nach zwölfstündiger Belichtung) Haematoporphyrin-Phosphoreszenz festzustellen, obwohl nur Phosphore verschiedener Grundmaterialien zur Beobachtung gelangten, die mit dieser Lichtquelle kräftige Fluoreszenz zeigten.[6] Daß es keine Intensitätsfrage ist, konnte damit gezeigt werden, daß bei Belichtung der gleichen Haematoporphyrin-Phosphore mit einer an Intensität schwächeren Glühbirne von 300 Watt deutliche Haematoporphyrin-Phosphoreszenz zu sehen war. Sehr kräftige Phosphoreszenz ergab eine große Kohlenbogenlampe (Stromstärke: 20 Amp., Kohlen: Conradty normal aktiv Nr. 4002). Daß die Erregungsverteilung der Haematoporphyrin-Phosphoreszenz nicht im Ultraviolett liegt, schien uns durch das negative Ergebnis mit der Quecksilberdampflampe bewiesen. Die nähere Festlegung des erregenden Wellenlängengebietes versuchten wir durch Beobachtung der Haematoporphyrin-Phosphoreszenz auf Intensität und Farbe nach Einschaltung von verschiedenen Filtern in den Strahlengang des erregenden Lichtes. Aus den für die verschiedenen Filter und für bestimmte Wellenlängen spektrophotometrisch gemessenen Durchlässigkeitswerten ist im Zusammenhang mit der durch diese Filter hindurch jeweils erregbaren Phosphoreszenzintensität die gesuchte Erregungsverteilung annähernd ersichtlich.

Obige Tabelle veranschaulicht die Erregungsverteilung der Haematoporphyrinphosphoreszenz in Gelatine. Bei Filterung des erregenden Lichtes mit einem Gelbfilter (Nr. 1 der Tabelle), für welches die Durchlässigkeit von 4200—4650 = 0 % ist und erst bei 4800 mit 1½ % einsetzt, ist eine sehr gute Haematoporphyrin-Phosphoreszenz zu beobachten; es kommt also der Spektralbereich

[6] Die von P. Pringsheim (49) ausgesprochene Vermutung, daß die Fluoreszenz und Phosphoreszenz fester Farbstofflösungen die gleiche Erregungsverteilung besitzen, trifft somit auf unsere Phosphore nicht zu.

No.	Filterart	Phosphoreszenz	4200	4350	4500	4650	4800	4900	5000	5100	5200	5300	5400	5500	5600	5700	5800	5900	6060	6450
1	Gelb	sehr gut	–	–	–	–	1,5	10,5	35	60	68	72	74	76	80	80	80	80	80	80
2	Grün	gut	0,1	0,5	+	14	27	35	44	50	52	52	52	49	41	36	29	27	8	5,5
3	Blau-grün	gut	3,7	+1	46	46	41	35	29	22	17	12	10	9	10	9	5	2,5	1,5	0,5
4	Blau-grün	gut	18	35	50	56	56	54	53	52	45	40	35	27	19	12	7,5	3	1	–
5	Grün-blau	mäßig	1.5	33	+2	52	48	40	37	33	27	18	12	8	3	1	0,1	–	–	–
6	Blau	schwach	71	61	50	42	26	17	11	6	3,5	1,3	1,1	1,5	3	2	1	0,5	0,5	–
7	Violett	sehr schwach	53	41	26	15	6	3	2,25	1,5	1,5	2	2,25	2	1,25	0,5	0,5	0.5	0,5	0,5
8	Blau	Spur	16	22	26	16	10,3	7	2,5	0,75	0,1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	Rot-gelb	Spur	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,1	0,5	1,25	6	16	32	51	63
10	Rot-gelb	Keine	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	32	87	87

Tabelle der bei der Untersuchung der Phosphoreszenzerregungsverteilung eines Gelatine-Haematoporphyrinphosphors verwendeten Filter mit ihren Durchlässigkeits-%-Zahlen für die einzelnen Wellenlängen.

von 4800 bis zum kurzwelligen Ende hin für die Erregung der Haematoporphyrin-Phosphoreszenz nicht in Frage. Andererseits ist nach Einschaltung eines rotgelben Filters (Nr. 10 der Tabelle), welches vom kurzwelligen Ende bis 5800 undurchlässig ist, aber bei 5900 bereits 32 % durchläßt, keine Haematoporphyrin-Phosphoreszenz wahrzunehmen, es ist also der Spektralbereich von 5800 bis zum langwelligen Ende hin ebenfalls nicht als Teil der Erregungsverteilung der Haematoporphyrin-Phosphoreszenz anzusehen. Durch die Verwendung weiterer Filter und besonders solcher, die gerade noch eine Spur von Haematoporphyrin-Phosphoreszenz erkennen lassen (siehe Filter Nr. 8 und 9 der Tabelle) kann gezeigt werden, daß als Erregungsverteilung der Haematoporphyrin-Phosphoreszenz der Spektralbereich zwischen 4800 und 5800 anzusehen ist und daß das Vorhandensein weiterer stark wirksamer Erregungsgebiete ausgeschlossen werden kann. Auf die Intensitätsverteilung innerhalb des wirksamen Bereiches gibt uns einen Hinweis der bemerkenswerte Umstand, daß wir mit der verhältnismäßig intensiven grünen Hg-Linie 5461, die doch in dem ermittelten erregenden Spektralbereich liegt, keine Haematoporphyrin-Phosphoreszenz beobachten konnten, wie eben der negative Ausfall der Versuche mit der Hg-Lampe als erregender Lichtquelle zeigt.

Genauere Angaben über die Erregungsverteilung der Phosphoreszenz lassen sich nach den bisherigen Untersuchungen nicht machen. Die genaue spektralphotometrische Untersuchung soll einer weiteren Arbeit vorbehalten bleiben.

IV. Untersuchung von Porphyrinphosphoren.

1. Herstellung der Porphyrinphosphore.

Zur Herstellung der Porphyrinphosphore benutzten wir in den meisten Fällen Haematoporphyrin-Lösung, welche uns die Fa. Nordmark freundlicherweise überließ (unter dem Namen Photodyn im Handel). Nach Angaben der Firma ist Haematoporphyrin Nencki enthalten im wässrig-sauren Medium von PH 2,0 0,5 %ig bezw. von 7,9 0,2 %ig (Ampulle).

Außer diesem Lösungsmittel verwendeten wir bei einer Reihe von Grundstoffen Haematoporphyrin in essigsaurer und alkoholischer Lösung, um den Einfluß des Lösungsmittels auf die Haematoporphyrin-Lumineszenz zu untersuchen, umsomehr als es zwischen mehreren Grundmaterialien und der Haematoporphyrin-Nordmarklösung zu einer Reaktion kam und wir das Haematoporphyrin in einem anderen Mittel lösen mußten. Bei den von uns hergestellten essigsauren und alkoholischen Haematoporphyrin-Lösungen verwendeten wir das Haematoporphyrin der Fa. Theodor Schuchardt. Görlitz. Außer Haematoporphyrin-Phosphoren stellten wir auch Aetioporphyrinphosphore her, wobei die wichtigsten und bei der Haematoporphyrin-Lumineszenz als vorteilhaft erwiesenen Grundstoffe verwendet wurden. Die Porphyrinkonzentration eines gut lumineszierenden Phosphors war von der Größenordnung $\frac{1}{2}$—$1\,^0/_{00}$.

Bei der Herstellung von Haematoporphyrin-Phosphoren aus kristallinischem Grundmaterial wie Aminosäuren, gelang es nicht regelmäßig, gut lumineszierende Phosphore zu erhalten. Es wurde so vorgegangen, daß man von dem Grundmaterial eine nahezu gesättigte Lösung herstellte und dieser einige Tropfen einer konzentrierten Haematoporphyrin-Lösung zusetzte, sodaß die Lösung gut gefärbt war. Von dieser Lösung wurden dann ein oder mehrere Tropfen auf ein Deckgläschen oder Glimmer gebracht und die Auskristallisation durch Lufttrocknen abgewartet oder durch Warmluft beschleunigt. Wiederholt mußten wir feststellen, daß die Verteilung des Haematoporphyrins in den kristallinischen Einbettungstoffen keine gleichmäßige war, was sich an der

fleckigen oder streifigen Anordnung der gut fluoreszierenden Stellen zeigte. Solche und wahrscheinlich noch andere Faktoren waren es wohl, welche die Herstellung von guten Haematoporphyrin-Phosphoren aus kristallinischen Grundstoffen unter gleichen Versuchsbedingungen nicht immer gelingen ließen. Bei einer Reihe von Aminosäuren wie Serin, α-Alanin, Glykokoll, Histidin und Aminovaleriansäure kam es beim Zusammenbringen mit der Haematoporphyrin-Lösung Nordmark zu einer deutlichen Reaktion, die in Form einer starken Haematoporphyrin-Agglutination in Erscheinung trat. Zu dieser Reaktion kam es nicht, wenn man diesen Aminosäuren Haematoporphyrin in essigsaurer Lösung zusetzte. Daraus geht hervor, daß es sich hierbei nicht um eine Wechselwirkung zwischen dem Haematoporphyrin und den Aminosäuren handelt, sondern um eine Reaktion zwischen dem Haematoporphyrin-Lösungsmittel und diesen Grundstoffen, wahrscheinlich auf verschiedenem PH beruhend. Eine weitere Aminosäure, das Tyrosin, ergab, mit der Haematoporphyrin-Nordmarklösung versetzt, einen Phosphor, der sich von den übrigen Aminosäurenporphyrinphosphoren durch eine violettrötliche Eigenfarbe auszeichnete. Die chemische Beziehung verschiedener als Einbettungsstoffe benützter Aminosäuren zum Harnstoff veranlaßte uns, auch in diesem Grundstoff die Haematoporphyrin-Lumineszenz zu untersuchen.

Die Herstellung von Haematoporphyrinphosphoren in glasigem Grundmaterial gelang viel sicherer.

Sehr kräftige Phosphore lieferte Zucker. Die Herstellung der Zuckerphosphore war folgende: Etwas Zucker wurde in einem kleinen Porzellantiegel in Zuckersyrup übergeführt und diesem einige Tropfen Haematoporphyrinlösung zugesetzt. Der gut gefärbte Syrup wurde dann auf Glimmer oder Deckgläschen ausgegossen, ein Verfahren, wodurch wir reine, vollkommen durchsichtige Zuckerplättchen von beliebiger Dicke erhielten. Ein Vorteil der Zuckerphosphore bestand darin, daß sich das Haematoporphyrin in dem Zuckersyrup gleichmäßig verteilte. Zucker war auch ein Grundstoff, der uns gestattete, Haematoporphyrin-Lumineszenz in zähflüssigem Medium zu untersuchen. Ein Nachteil war, daß die Zuckerphosphore höchstens nur einige Tage ohne auszukristallisieren erhalten blieben und daher immer frisch hergestellt werden mußten. Bei der Herstellung der verschiedenen Zuckersyrups war darauf zu achten, daß es nicht zur Karamelbildung kam. Durch die Entstehung von Karamel wird die Haematoporphyrin-Lumineszenz stark beeinträchtigt oder überhaupt zerstört, je nach dem Grad der Karamelbildung, eine Feststellung, die des öfteren gemacht werden konnte, da es nicht immer gelang, beim Schmelzen des Zuckers die Karamelbildung zu verhindern. Es bleibt dabei die Frage offen, ob dieser Vorgang auf einer Veränderung des Haematoporphyrins durch

Karamel beruht oder ob die Anwesenheit von Karamel bezw. dessen Lumineszenz und Absorption die Haematoporphyrin-Lumineszenz auslöscht, was durch Absorptionsaufnahmen von Lösungen aus karamellisierten Haematoporphyrinphosphoren unter Umständen zu klären wäre.

Zur Herstellung von Gelatinephosphoren benutzten wir von den Deutschen Gelatinefabriken, Schweinfurt, zur Verfügung gestellte pulverisierte Gelatine Nr. 2 und 4, von welchen uns letztere wegen ihrer größeren Eigenabsorption und Eigenlumineszenz weniger geeignet erschien. Es ließen sich aber auch mit der gewöhnlichen festen Küchengelatine gute Haematoporphyrinphosphore herstellen. Die Herstellungsweise der Gelatinephosphore war folgende: Etwas Gelatine wurde in einem Wasserbad verflüssigt, einige Tropfen konzentrierte Haematoporphyrinlösung zugesetzt und die gut gefärbte Gelatinelösung auf Glimmer oder Deckgläschen ausgegossen, worauf das Erstarren an der Luft abgewartet wurde. Obwohl sich das Haematoporphyrin gleichmäßig im Medium verteilte, gelang die Zubereitung von gut lumineszierenden Gelatineplättchen nicht immer gleich gut. Diese Beobachtungen machten auch Wawilow und Lewschin, ohne daß auch sie einen Grund hierfür angeben könnten. Sie schreiben: „Die Vorbereitung des phosphoreszierenden Gelatinehäutchens gelingt nicht immer gut. Ein mit Fluoreszëin angefärbtes Häutchen zeigte z. B. schöne Phosphoreszenz, die mehr als 1 Sekunde dauerte, das andere fast keine". Es wäre möglich, daß die bei den einzelnen Präparationen wechselnde PH-Konzentration, deren Einfluß auf die Lumineszenzintensität durch Fink bewiesen und für die einzelnen Porphyrine festgestellt wurde, eine ausschlaggebende Rolle spielt. Ein Vorteil der Gelatinephosphore muß auch darin erblickt werden, daß sie in äußerst dünnen Schichten herstellbar sind, was für spektrographische Lumineszenzaufnahmen in Durchsicht wichtig ist. Außerdem haben die Gelatinephosphore eine lange Lebensdauer. Wir konnten nach Untersuchung eines 2 Jahre alten Gelatine-Haematoporphyrinphosphors keine sichere Abnahme der Lumineszenzfähigkeit feststellen!

Serum als Einbettungsmaterial verwendet ergab gute Haematoporphyrinphosphore. Zu diesem Zweck wurde menschliches Serum mit konzentrierter Haematoporphyrinlösung angefärbt und davon 1 Tropfen auf einem Glimmerplättchen eingetrocknet. Es wurden wie bei Gelatine sowohl Serumphosphore untersucht, die noch weich und elastisch waren, als auch solche von harter Konsistenz. Die Lumineszenz der Haematoporphyrinserumphosphore wurde aber wegen der Undefinierbarkeit des Grundmaterials nicht quantitativ untersucht.

Bei der Zubereitung von Kollodiumphosphoren wurde Kollodium technic. 6%ig der Fa. Schering verwendet. Konz. Haemato-

porphyrinalkohollösung (Haematoporphyrin der Fa. Schuchardt, Görlitz, Alkohol 96%ig) oder konz. essigsaure Haematoporphyrinlösung wurde dem zähflüssigen Kollodium beigesetzt und gut geschüttelt, um eine Durchdringung des Kollodiums mit Haematoporphyrin zu erreichen. Zu Kollodium Haematoporphyrin-Nordmarklösung zugesetzt ergab ebenfalls gut lumineszierende Phosphore. Man erhielt jedoch keine durchsichtigen Kollodiumhäutchen, sondern es bildete sich wahrscheinlich infolge chemischer Umsetzungen eine undurchsichtige, weißlich-rosa gefärbte Masse. Deshalb haben wir dem Kollodium das Haematoporphyrin in alkoholischer bezw. essigsaurer Lösung zugesetzt, was die Darstellung durchsichtiger Kollodiumhäutchen ermöglichte. Die Kollodiumphosphore haben den Nachteil, daß sie beim Eintrocknen ihre in zähem Zustand glatte Oberfläche infolge der starken Kontraktion verlieren und eine mehr oder weniger stark deformierte Oberfläche aufweisen, womit meistens auch eine unregelmäßige Verteilung des Porphyrins verbunden ist. Einige Beobachtungen zeigten auch, daß die Lumineszenzintensität der Kollodiumporphyrinphosphore im Laufe der Zeit abnimmt. Genaue Messungen über Abnahme der Lumineszenzintensität der Porphyrinphosphore wurden aber nicht angestellt.

Bei der Darstellung der Borsäureporphyrinphosphore, welche die schwierigste war, gelangte Acid. boricum fusum der Fa. Merck zur Verwendung. Die beste Porphyrinlumineszenz in Borsäure erhielten wir, wenn wir der mit etwas aqua dest. versetzten Borsäure unsere Porphyrinlösung zugaben und auf einem verzinnten Weißblech allmählich erhitzten. Der damit einsetzende Entwässerungsprozeß bedingte allerdings einige unerwünschte Nebenerscheinungen. Durch das lebhafte Entweichen von Wasserdämpfen kommt es zu starker Blasenbildung und es entwickelt sich eine glasige, seifenschaumartige Schmelze von äußerst unregelmäßiger Oberflächenbeschaffenheit, da durch das Einsinken von Blasen mondkraterartige Gebilde entstehen. Bei der Entwässerung des Borsäurehydrats verteilt sich außerdem das Porphyrin ziemlich unregelmäßig im Grundstoff. Ein weiterer Nachteil der Borsäurephosphore ist die kurze Dauer ihrer Lumineszenzfähigkeit.

Schnell und leicht herzustellen sind die Papierphosphore. Man bringt auf Seiden- oder dünnes Filtrierpapier einige Tropfen der Porphyrinlösung und läßt sie trocknen. Die Papierporphyrinphosphore sind, abgesehen von der Einfachheit und Sicherheit der Herstellung, wegen ihrer sehr beachtlichen Lumineszenzintensität bemerkenswert. Die Papierphosphore haben aber den Nachteil, daß sie unter Lichteinfluß ausbleichen.

2. Okulare Lumineszenzuntersuchung der Haematoporphyrinphosphore in Aufsicht.

a) Versuchsanordnung.

Bei der okularen Untersuchung des Fluoreszenz- und Phosphoreszenzlichtes der Haematoporphyrinphosphore bedienten wir uns einer Versuchsanordnung, die uns gestattete, die lumineszierenden Körper in Aufsicht zu beobachten (s. Fig. 2 u. 3). Trotz den für unsere Zwecke ungünstigen Unregelmäßigkeiten im Brennen diente eine große Kohlenbogenlampe K (Stromstärke: 20 Amp.. Kohlen: Conradty Normal aktiv 4002) als erregende Lichtquelle, da eine Reihe von Untersuchungen mit der Quecksilberdampflampe (Heräus Hanau) gezeigt hatten, daß die von einer Quecksilberlampe ausgesandten Strahlen zwar gute Haematoporphyrinfluoreszenz lieferten, aber nicht imstande waren, die Haematoporphyrinphosphore zum Nachleuchten zu erregen (siehe Kap. Erregungsverteilung). Zur Beobachtung der Lumineszenz eines Phosphors im Phosphoroskop PH wurde dieser auf das kleine Tischchen T gebracht, welches, senkrecht zur Phosphoroskopachse an dieser befestigt, in einem Winkel von etwa 45° sowohl zur Richtung der erregenden Strahlen als auch zur Blickrichtung des Beobachters A geneigt war. Das Phosphoroskop bestand aus zwei Trommeln Tr_1 und Tr_2, von denen die eine Tr_1 durch eine daran befestigte Riemenscheibe mittels eines Elektromotors M und Schnurlauf um die Achse rotierte, während die andere Tr_2 nach der Befestigung des Phosphors auf dem Tischchen über die rotierende Trommel hinübergeschoben und fixiert wurde. Dabei war darauf zu achten, daß die Trommel so festgestellt wurde (s. Fig. 3), daß alle auf dem Trommelmantel M_1 der rotierenden Trommel angebrachten Öffnungen verdeckt waren und nur die einzige an dem Trommelmantel M_2 der festen Trommel angebrachte Öffnung die erregenden Strahlen gut in das Phosphoroskop eintreten und auf den Phosphor fallen ließ. An der rotierenden Trommel waren die Öffnungen an der Vorderwand, durch welche das Auge des Beobachters den Phosphor sieht, gegenüber den Öffnungen am Trommelmantel, durch welche die erregenden Lichtstrahlen den Phosphor trafen, versetzt angebracht, d. h. man konnte den Phosphor und damit das von ihm emittierte Licht nur sehen, wenn das erregende Licht abgeschnitten war. (Die Beobachtung erfolgte durch die Linse L_2.) Nur eine Öffnung war an der vorderen Wand der rotierenden Trommel so angebracht, daß man den Phosphor im Augenblick der Erregung beobachten konnte (s. Fig. 3). Diese Öffnung war bei den Phosphoreszenzversuchen verschlossen. Durch diese Anordnung ließen sich Fluoreszenz und Phosphoreszenz an ein und demselben Phosphor vom gleichen Beobachtungspunkt aus untersuchen. Die vom Kohlenbogen ausgehenden Lichtstrahlen wurden durch die Quarzlinse L_1 auf das

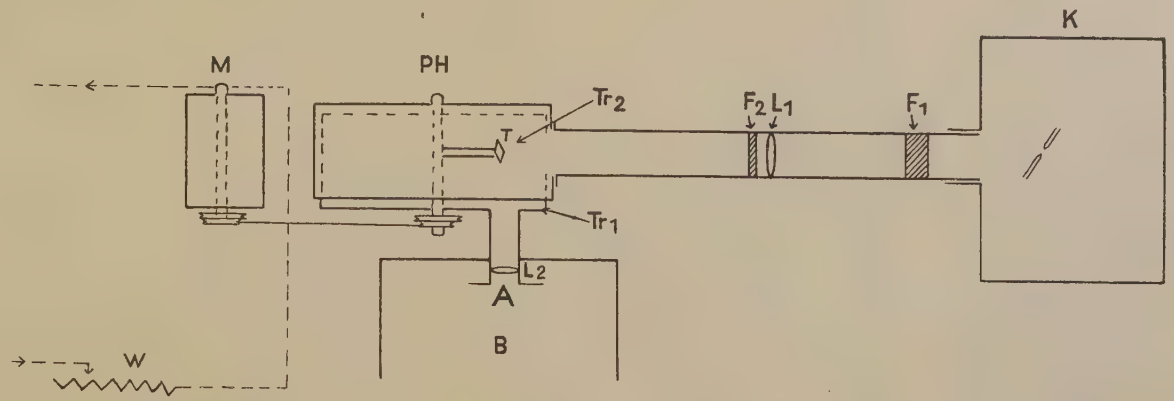


Fig. 2

Versuchsanordnung zur okularen Fluoreszenz- und Phosphoreszenzbeobachtung.

A = Auge des Beobachters, B = Beobachtungsgehäuse, K = Kohlenbogenlampe. F_1 = Kupfersulfatfilter, F_2 = Uviolglasfilter (UG 2), L_1 = Sammellinse aus Quarz, L_2 = Beobachtungslinse, PH = Phosphoroskop, Tr_1 = rotierende Trommel, Tr_2 = feststehende Trommel, T = Tischchen mit Phosphor, M = Elektromotor, W = Schiebewiderstand.

Tischchen im Phosphoroskop gesammelt. Bei der Fluoreszenzbeobachtung waren in den Strahlengang ein Trog mit $CuSO_4$-Lösung geeigneter Konzentration zur Wegnahme des störenden Rot sowie ein Uviolglasfilter UG 2 (Schott) zur Wegnahme des meisten sichtbaren Lichtes eingeschaltet. Bei der Phosphoreszenzbeobachtung wurden beide Filter entfernt. Mit Hilfe eines Schiebewiderstandes W konnte die Umlaufzahl des Phosphoroskops geregelt werden (bis etwa 600 in der Minute). Große Sorgfalt legte ich auf das Ausschalten alles fremden Lichtes, das wegen der z. T. sehr geringen Intensität der Leuchterscheinungen äußerst störend gewesen wäre. Zu diesem Zweck war die Lampe in einem Blechgehäuse eingeschlossen und die erregenden wie auch die ausgesandten Lichtstrahlen wurden in innen geschwärzte Röhren geleitet. Alle Beobachtungen wurden erst gemacht nach 15 Minuten Adaption in einem innen geschwärzten Beobachtungsgehäuse B. Die Temperatur in der Trommelnähe erreichte 22—25° C.

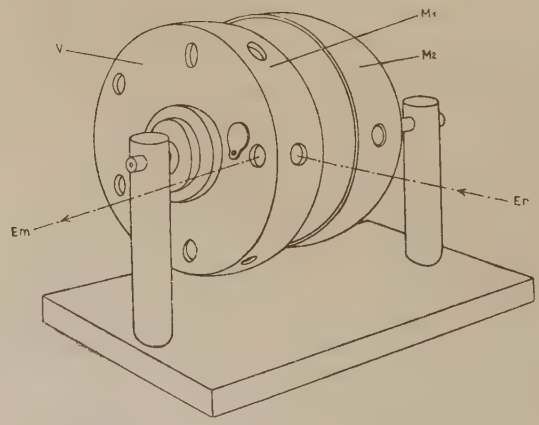


Fig. 3
Das Phosphoroskop.

V = Vorderwand der rotierenden Trommel
M_1 = Mantel der rotierenden Trommel
M_2 = Mantel der feststehenden Trommel
Er = Richtung des erregenden Lichtes
Em = Richtung des emittierten Lichtes

b) Die Eigenlumineszenz der Grundstoffe.

Von den 35 verschiedenen Medien, in die wir das Porphyrin einbetteten, wurde zunächst einmal die Eigenfluoreszenz genau beobachtet. Eine solche fand sich in mehr oder weniger starkem Maße bei fast allen Grundstoffen. Die Intensität der Eigenfluoreszenz war verschieden stark. Sie schwankte zwischen einem fraglichen bezw. gerade noch wahrnehmbaren Lichtschimmer (Kollodium, Serin, Glutaminsäure) und einer sehr kräftigen Fluoreszenz wie bei den Zuckern, Albumen ovi, Prolin, Arginin.[7] Die Farbe des von den Grundstoffen selbst ausgestrahlten Fluoreszenzlichtes zeigte eine mannigfaltige Verschiedenheit, Farbtöne vom Dunkelblau bis zum Grünlichen.

Ähnlich stand es mit der Eigenphosphoreszenz dieser Grundmaterialen. Nur bei Kollodium konnten wir trotz mehrfach angestellter Versuche keine Eigenphosphoreszenz beobachten. Wieder schwankte die Farbe zwischen Dunkelblau und Grünlich, wobei aber immer eine Untermalung mit als Weiß empfundenem Licht deutlich war. Manche Medien ließen nur eine so schwache Phosphoreszenz erkennen, daß eine Farbe nicht mehr empfunden werden konnte, wie denn überhaupt die Abhängigkeit des Farbeindrucks von der Intensität deutlich wahrnehmbar war. Die Abklingungsdauer des Nachleuchtens betrug bei der Mehrzahl der Grundstoffe etwa 3—4 Sekunden, bei einigen sogar bis zu 8 Sekunden, und war bei Histidin am längsten, wo sie mit 10½ Sekunden gestoppt werden konnte.

Obwohl das Momentan- und Dauerleuchten der verwendeten Grundstoffe in einem für unsere Zwecke günstigen Wellenlängengebiet lag, versuchten wir doch bei einigen (wie Zucker und Gelatine) es durch Reinigungsverfahren zu beseitigen. Trotz Anwendung mehrmaliger Filtration der Zuckerlösung durch Tierkohle und Warmfiltration der Gelatine konnte auch beim Arbeiten mit doppelt destilliertem Wasser die Eigenlumineszenz dieser Körper nicht merklich geschwächt oder gar zum Schwinden gebracht werden.

c) Ergebnisse der Fluoreszenzbeobachtungen.

In 35 verschiedene Medien eingebettet zeigte das Haematoporphyrin immer ein rotes bis gelbrotes Momentanleuchten. Die Intensität war in den einzelnen Grundstoffen sehr verschieden. Sehr starke Haematoporphyrinfluoreszenz lieferte Borsäure. Es folgen dann in Abständen Prolin, Stärke, Traubenzucker, Papier, Gelatine, Kollodium, Serum, Albumen ovi, Glykogen. Stark und ungefähr

[7] Über Eigenfluoreszenz der Kohlehydrate, Eiweißkörper, Aminosäuren siehe Dhéré, Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden II. 3, 3203.

gleichwertig war die Fluoreszenz in den Aminosäuren Leucin, Asparagin, Histidin, Lysin, Ornithin und Aminovaleriansäure. Haematoporphyrinfluoreszenz von mittlerer Intensität lieferten Galaktose, Saccharose, Mannose, Arabinose, Laevulose, Alanin, Arginin, Cystin, Tyrosin, Oxy-Prolin und Lysin. Bei Harnstoff, Glykokoll und Glutaminsäure ist sie als schwach zu bezeichnen und erscheint bei Serin überhaupt fraglich. Die Beobachtungen über die Intensität des Fluoreszenzlichtes, welche an mehreren Phosphoren vom gleichen Grundmaterial gemacht wurden, wobei auch die Präparationsbedingungen etwas geändert wurden, hatten mit geringen Abweichungen die gleichen Ergebnisse. Eine geringe Abhängigkeit der Intensität vom Lösungsmittel des Haematoporphyrins ergab sich insofern, als bei manchen Phosphoren die Fluoreszenz stärker bezw. schwächer war, je nachdem das Haematoporphyrin in essigsaurer oder alkoholischer Lösung zugesetzt wurde. Damit war zumeist eine Farbtonänderung verbunden, wodurch vielleicht die Intensitätsunterschiede zu erklären sind.

Die Farbe des emittierten Fluoreszenzlichtes ist bei den einzelnen Phosphoren verschieden. Sie schwankt zwischen Gelbrot und Karmoisinrot, wobei sehr feine Abstufungen der Farbtöne wahrnehmbar sind; es erscheint aber als wertlos, sie an dieser Stelle näher anzuführen, da die Benennung dieser feinsten Abstufungen schwierig und nicht einheitlich ist. Auch sind die okularen Beobachtungen der Farbtöne des Fluoreszenzlichtes mit Vorsicht zu verwerten, da die mehr oder weniger starke Emission des Eigenfluoreszenzlichtes der Grundmaterialien Täuschungen im Farbton hervorrufen kann, welche bei spektrographischen Aufnahmen wegfallen. Die Eigenfluoreszenz der Grundstoffe wird übrigens durch die Absorption der erregenden und der ausgesandten Strahlen durch den zugesetzten Farbstoff verändert und häufig sehr geschwächt. Wir verzichten also darauf, die feinen, okular beobachteten Unterschiede hier wiederzugeben, und verweisen auf unsere spektrographischen Fluoreszenzaufnahmen (s. Kap. IV 3). Es soll nur gesagt werden, daß die okularen Beobachtungen mit den spektrographischen Messungen insofern übereinstimmen, als die mehr gelbrot fluoreszierenden Phosphore kurzwelligeres Licht (etwa 5900 bis 6300 Å) emittieren, während die mehr dunkelrot fluoreszierenden Porphyrinphosphore langwelligeres Licht aussenden, z. B. Borsäure bis 7320 Å.

d) Ergebnisse der Phosphoreszenzbeobachtungen.

Während in allen untersuchten Grundstoffen das eingebettete Haematoporphyrin mehr oder weniger starkes Momentanleuchten aufwies, ist die Zahl der Medien, in denen auch ein Nachleuchten des Haematoporphyrins beobachtet werden konnte, bedeutend ge-

ringer, woraus hervorgeht, daß die Bedingungen für das Zustandekommen der Haematoporphyrinphosphoreszenz ganz andere sind.

Die Intensität des Nachleuchtens war bei manchen Phosphoren so stark, daß man es ohne längere Adaption auch aus größerer Entfernung gut sehen konnte. Bei manchen Stoffen dagegen war es so schwach, daß erst nach langer Adaption ein rötlicher Schimmer zu beobachten war. Von den organischen Grundstoffen zeigt Prolin die weitaus beste Haematoporphyrinphosphoreszenz. Es folgen dann die ungefähr gleichwertigen Phosphore in Albumen, Glykogen, Gelatine, Serum und Zuckern. Von den Zuckerphosphoren weisen Glukose, Saccharose und Galaktose gutes Nachleuchten auf, während es bei Arabinose, Mannose und Lävulose schwächer ist. Die Aminosäure Arginin emittierte ganz schwaches Haematoporphyrinphosphoreszenzlicht.

Daß gerade Prolin eine ausgezeichnete Haematoporphyrinphosphoreszenz liefert, während in 15 weiteren Aminosäuren das eingebettete Porphyrin nicht zur Phosphoreszenz erregt werden konnte, dürfte mit dem chemischen Bau und der dadurch ermöglichten Wechselwirkung zwischen Farbstoff- und Grundstoffmolekül zusammenhängen. Wenn man die Struktur des Prolins im Vergleich zu den untersuchten Aminosäuren betrachtet, so findet man, daß es sich von diesen durch eine wichtige Tatsache unterscheidet. Prolin = α-Pyrrolidincarbonsäure enthält den Stickstoff im Ring gebunden, ist also keine eigentliche Aminosäure. Eigenartig ist, daß Haematoporphyrin in Oxy-Prolin eingeschlossen nicht zur Phosphoreszenz erregt werden kann. Vielleicht können diese Feststellungen einen Hinweis geben auf die Wechselwirkung, die zwischen Farbstoffmolekül und den benachbarten Stoffen stattfindet, über deren Art mehrere Forscher für einzelne Grundstoffe verschiedene Theorien wie einfache Adsorption an Grenzflächen, dreidimensionales Eingeschlossensein, Deformierung der Moleküle, Eintritt in das Kristallgitter, bimolekulare Reaktion, aufstellten (s. Kap. II 2). Daß bei einigen Grundmaterialien mit bläulicher Eigenphosphoreszenz nach Einbettung des Haematophorphyrins überhaupt keine Phosphoreszenz mehr wahrnehmbar war, erklärten wir uns durch einfachen Absorptionseffekt.

Die Farbe des Phosphoreszenzlichtes war bei den meisten Haematoporphyrinphosphoren gelbrot. Sie schien uns aber deutlich abhängig von der Konzentration, wodurch sie bis zum Dunkelroten schwanken konnte. Hieraus ergibt sich, daß, wie bei der Fluoreszenz, die Eigenlumineszenz der Grundmaterialien einen Einfluß auf den wahrnehmbaren Farbton ausübt. Durch die mehr oder weniger starke Absorption des Eigenphosphoreszenzlichtes sind die mit wechselnder Konzentration beobachteten verschiedenen Farbtöne im Phosphoreszenzlicht zu erklären.

Die Abklingungsdauer des Phosphorenzlichtes der Porphyrinphosphore bewegte sich in einer Größenordnung von 1/100 Sekunde bis 1 Sekunde. Sie war nicht leicht zu messen, da nach der Emission des Haematoporphyrinphosphoreszenzlichtes die bläuliche Emission des Eigenphosphoreszenzlichtes der Grundmaterialien meist noch mehrere Sekunden dauerte. Die Grenze, an der das Porphyrin-Nachleuchten verschwand, wurde als farblos empfunden. Daß ein Zusammenhang zwischen Phosphoreszenzintensität und Abklingungsdauer festgestellt werden konnte, ist leicht erklärlich. Es muß aber betont werden, daß auch die Abklingungsdauer verschiedener Phosphore von gleicher Intensität verschieden lang war. Eine auffallend lange Abklingungsdauer (bis 1 Sekunde) zeigten Gelatine, Glykogen und Albumen ovi.

3. Spektrographische Fluoreszenzuntersuchungen in Durchsicht.

Die Auswahl der Phosphore wurde getroffen nach den Ergebnissen von Fluoreszenzaufnahmen mit einem kleineren, bedeutend lichtstärkeren Spektrographen mit Flüssigkeitsprisma (siehe Kap. IV 4). Die Belichtungszeiten waren hier wesentlich kürzer, der Apparat hatte aber für unseren Zweck den Übelstand einer geringeren Dispersion. Phosphore, welche mit diesem Spektrographen kräftige Fluoreszenzspektren lieferten, wurden dann zum Zweck einer genaueren Auswertung mit dem Spektrographen größerer Dispersion aufgenommen.

a) Versuchsanordnung (s. Fig. 4).

Als Lichtquelle zur Erregung der Fluoreszenz wurde eine Quarzquecksilberlampe (Heraeus, Hanau) Hg (Stromstärke: 3,5 Amp., Lichtintensität 3000 H.K.) benützt, die in einem lichtdichten Kasten K untergebracht war. Der Lampenkasten war zur Erhaltung einer konstanten Temperatur mit einem Luftabzugsrohr versehen. An der Vorderwand des Lampenkastens war eine verschiebbare Blende Bl angebracht, welche gestattete, die Austrittsöffnung des Lichtes optimal zu wählen. Das Licht der Lampe durchsetzte ein 2 mm starkes UG 2 - Filter der Fa. Schott, Jena (F_1). Die Durchlässigkeit des UG 2 - Filters wurde vorher geprüft und das Ergebnis durch eine Leeraufnahme bestätigt. Sie beträgt für 7000 Å etwa 1,7 %, für 4050 Å weniger als 0,1 %. Außerdem war zur Wegnahme des störenden Rots und Ultrarots ein Quarztrog mit Kupfersulfatlösung F_2 in den Strahlengang gebracht. Die Konzentration der Kupfersulfatlösung wurde durch Beobachtung so gewählt, daß in dem für die Fluoreszenz in Frage kommenden Gebiet kein Rot mehr durchging, was durch eine Leeraufnahme bestätigt wurde. Das Licht der Lampe wurde mit einer großen Quarzlinse L auf den Spalt Sp zentriert. Zur möglichst guten Ausnützung des Fluores-

zenzlichtes wurden die zu untersuchenden Phosphore PH ganz dicht vor den Spalt gebracht. Aus dem gleichen Grunde wurden möglichst durchsichtige und dünnschichtige Phosphore verwendet. Soweit es die verwendeten Grundmaterialien zuließen, wurden die Phosphore ohne Unterlage untersucht (Gelatine, Kollodium). Die verschiedenen Zucker- und Eiweißsubstanzen dagegen wurden auf Deckgläschen von 0,2 mm Dicke untersucht, wobei sie so vor dem Spalt befestigt waren, daß ihre Phosphorschicht der Lichtquelle zugewandt war. Die Stamm-Haematoporphyrinlösung sowie die 10%ige und 30%ige Traubenzuckerhaematoporphyrinlösung wurde in einem Quarztrog, welcher ebenfalls ganz dicht vor dem Spalt befestigt war, untersucht. Die Abstände zwischen Lampe, Filter, Kupfersulfattrog, Phosphor und Spalt waren immer die gleichen. Die Spaltweite war bei allen Fluoreszenzaufnahmen die gleiche und zwar 0,16 mm.

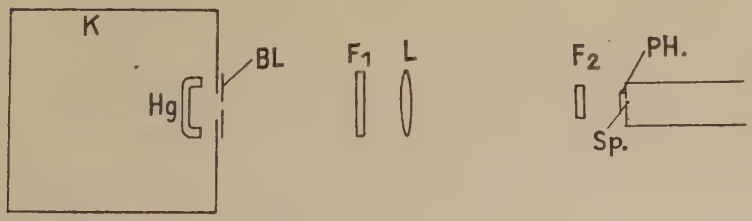


Fig. 4

Versuchsanordnung zu den spektrographischen Fluoreszenzaufnahmen in Durchsicht.

Hg = Quecksilberdampflampe, K = Lampengehäuse, Bl = verschiebbare Blende, L = Sammellinse, F_1 = Uviolglasfilter (UG 2), F_2 = Kupfersulfatfilter, PH = Phosphor, Sp = Spalt des groß. Dreiprismenspektrographen.

Für die Aufnahmen wurde der Glasspektrograph GH der Fa. Steinheil, München, mit 3 Prismen verwendet. Im Anfang des für unsere Fluoreszenz in Frage kommenden Bezirkes hatte der Apparat eine Dispersion von etwa 80 Å auf 1 mm, gegen Ende von etwa 130 Å auf 1 mm. Fig. 5 gibt die Dispersionskurve wieder.

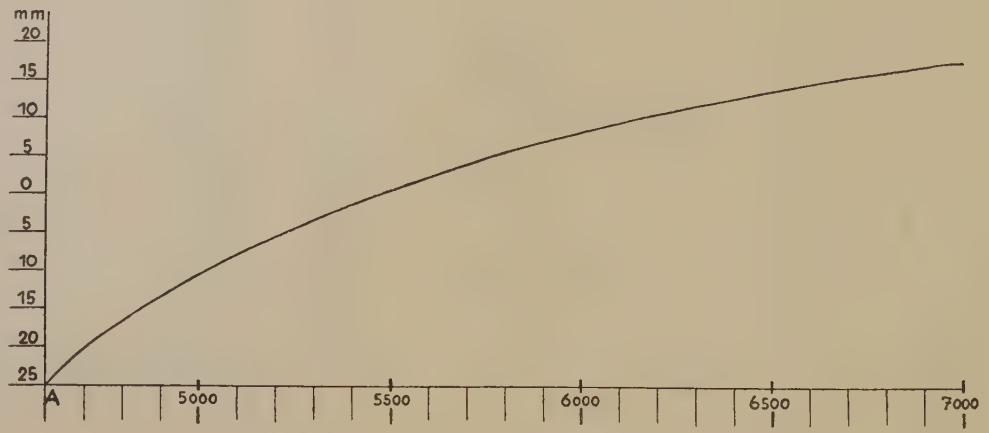


Fig. 5

Dispersionskurve zu den Fluoreszenzaufnahmen.

Auf der Abszisse sind die Wellenlängen in Å-Einheiten, auf der Ordinate die Abstände der Eichlinien in mm eingetragen. Als Nullpunkt wurde die Hg-Linie 5461 gewählt.

Als Vergleichsspektrum diente das Spektrum der benützten Quecksilberlampe, sowie das Spektrum von Wasserstoff und Helium im Geißlerrohr. Als Negativmaterial wurden Agfa-Superpanplatten verwendet. Diese Platten, welche bei 26° Sch. eine hohe panchromatische Sensibilisierung für grüne, gelbe und rote Strahlen haben, werden nach einer Desensibilisierung in einem Vorbad von Pinakryptol-Grün (1 : 10 000 verdünnt) von 3 Minuten wie gewöhnliche Platten entwickelt.

b) Ergebnisse.

Zur Festlegung des Unterschiedes zwischen Haematoporphyrin- und Aetioporphyrinfluoreszenz haben wir nur wenig Aufnahmen gemacht, da das schwerer lösliche Aetioporphyrin wegen der zur Phosphorbereitung notwendigen großen Konzentration nur in essigsaurer Lösung verwendet werden konnte. Der Unterschied zwischen Haematoporphyrin- und Aetioporphyrinfluoreszenz ist in Gelatine gering und liegt innerhalb unserer Fehlergrenze. In Traubenzucker sind bei der Aetioporphyrinfluoreszenz die beiden kurzwelligeren Banden nach dem kurzwelligen Ende verschoben. In Stärke zeigt die Aetioporphyrinfluoreszenz eine Bande weniger (6110—6250), während die übrigen Banden an der gleichen Stelle wie bei der Haematoporphyrinfluoreszenz liegen. Was die Intensitätsverteilung der Banden im Fluoreszenzspektrum beider Porphyrine betrifft, so finden wir für Gelatine einen deutlichen Unterschied insofern, als beim Aetioporphyrin eine Bande (6450—6560) geringere Intensität aufweist (s. Fig. 6 u. Spektrogr. II).

Den Einfluß des Haematoporphyrinlösungsmittels auf die Emission des Fluoreszenzlichtes haben wir ebenfalls untersucht und außer mit Nordmarklösung auch mit essigsaurer und alkoholischer Haematoporphyrinlösung hergestellte Gelatine-, Stärke-, Traubenzucker- und Prolinphosphore vergleichsweise aufgenommen. Es ergibt sich, daß die bis jetzt untersuchten (flüchtigen!) Haematoporphyrinlösungsmittel, welche bei der Fluoreszenzemission von Lösungen auf Lage und Intensitätsverteilung der Fluoreszenzbande einen großen Einfluß ausüben, bei unseren festen Lösungen keine große Rolle spielen, da sowohl hinsichtlich Lage als auch Intensitätsverteilung kein die Fehlergrenze überschreitender Unterschied festgestellt werden konnte (s. Fig. 6 u. Spektrogr. II).

Um über den Einfluß der Zähigkeit des Mediums auf die Fluoreszenz ein Bild zu bekommen, machten wir Fluoreszenzaufnahmen von zähflüssigen Zuckerphosphoren (Traubenzucker). Die Fluoreszenzspektren der zähflüssigen Zuckerphosphore waren die gleichen wie die der bereits vollkommen erstarrten. Die Fluoreszenz einer 10%igen und einer 30%igen Traubenzucker-Haemato-

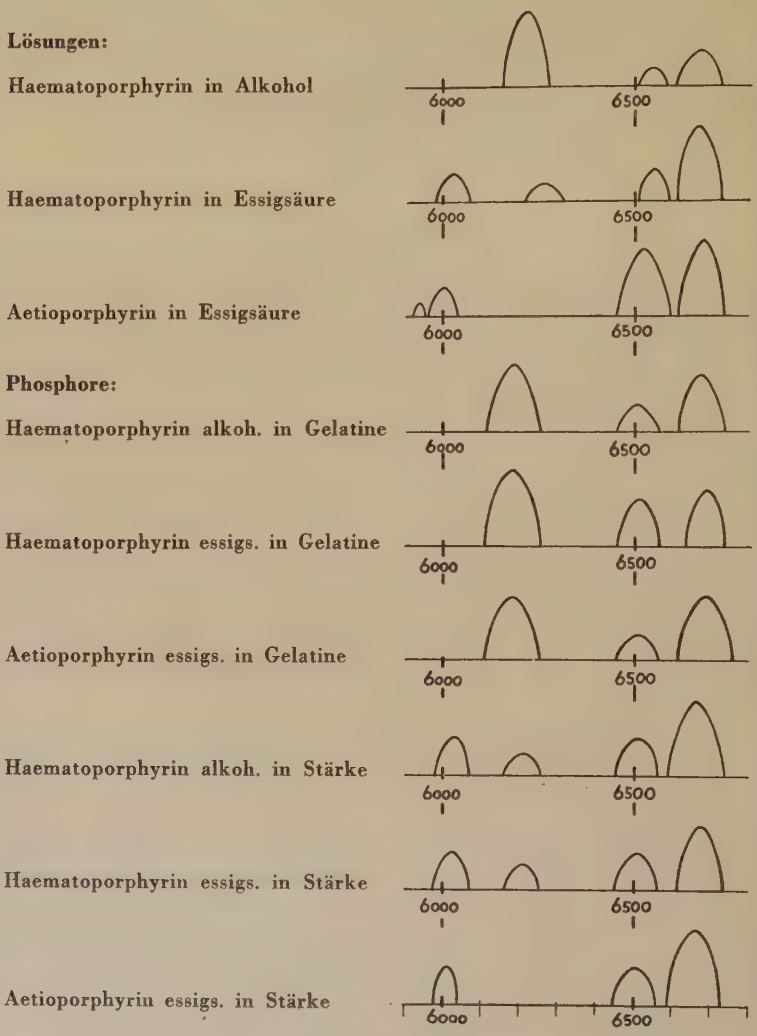


Fig. 6

Die Lage der Fluoreszenzbanden von Haematoporphyrin- und Aetioporphyrinphosphoren mit verschiedenem Lösungsmittel und Grundmaterial in schematischer Darstellung.

porphyrinlösung zeigte dagegen deutlich ein anderes Spektrum (s. Spektrogr. I).

Innerhalb einer langen Versuchsreihe ergab sich aus der Art des emittierten Fluoreszenzlichtes eine klare Zusammengehörigkeit verschiedener Phosphore hinsichtlich ihrer Grundstoffe. Dieses Ergebnis ließ sich aber bei einer anderen Versuchsreihe nicht gleichartig reproduzieren, ohne daß uns die wirksamen Umstände im einzelnen bekannt wären.[8] Verschiedenes Alter der verwandten Porphyrinlösungen, Änderungen bezw. Verbesserungen der Plattenemulsionen, Unterschiede im Entwicklungsverfahren können hier eine große Rolle spielen.[9] Vor allem ist zu berücksichtigen, daß verschiedene Emulsionen der gleichen Plattenmarke Unterschiede in der spektralen Empfindlichkeit aufweisen, wovon wir uns durch Aufnahmen überzeugen konnten.

Nach H. Hellström (37) ist die Intensitätsverteilung der einzelnen Fluoreszenzbanden auch von der Erregerfrequenz abhängig. Die Konstanz der erregenden Strahlen ist also von großer Bedeutung und das „Altern" der Lichtquelle muß unter Umständen auch berücksichtigt werden.

Um die absolute spektrale Verteilung der Fluoreszenz kennen zu lernen, wäre Plattenphotometrierung und quantitative Festlegung der spektralen Empfindlichkeit (= Schwärzungskurve) der verwandten Platten bei konstantem Entwicklungsverfahren erforderlich.[10]

Um diesen technischen Schwierigkeiten, vor allem den feinen Entwicklungsunterschieden einigermaßen auszuweichen, sind wir so vorgegangen, daß wir eine Reihe von Fluoreszenzaufnahmen, besonders die vergleichender Art, jeweils auf ein und dieselbe Platte machten.

Im Folgenden geben wir einen Überblick über eine größere zusammenhängende Versuchsreihe, bei der hauptsächlich der Einfluß

---

[8] Insofern ist die Bandenzahl, die wir in einer vorläufigen Mitteilung (Verhandlungen d. Deutsch. Ges. f. Inn. Med. XLV. Kongr. 1933) angegeben hatten, nicht mehr aufrecht zu erhalten, ohne daß das Grundsätzliche der damaligen Bemerkung davon berührt wird.

[9] Auch bei Lösungen erhielt Dhéré für Haematoporphyrin in Essigsäure Ergebnisse, die von Königsdörffer nicht bestätigt werden konnten. Dhéré schreibt: „Eine Haematoporphyrinlösung in Essigsäure hatte uns ein ziemlich abweichendes Fluoreszenzspektrum geliefert, das unseres Erachtens einem dritten Typ entsprechen mußte. Aber nach einigen von Königsdörffer gemachten Beobachtungen sollte diesem Typus die von uns vermutete Konstanz und Allgemeingültigkeit nicht zukommen. Die Untersuchung dieser Frage muß erneut in Angriff genommen werden." Ch. Déhré: Nachweis biologisch wichtiger Körper durch Fluoreszenz und Fluoreszenzspektren. Abderhalden, Handb. d. biolog. Arbeitsmeth. II, 3, 3236, 1933.

[10] Solche Untersuchungen sind in Vorbereitung.

der Grundmaterialien auf die Emission des Fluoreszenzlichtes untersucht wurde. Es wurden Agfa-Superpanplatten verwandt (Emulsionsnummer F 1013 u. f.) und mit Agfa-Rodinal 1:20 entwickelt. Wir haben bei Wiederholungen der Aufnahmen, bei denen mit Absicht auf die gleiche Platte eine Reihe von Phosphoren gleicher und verschiedener Gruppe aufgenommen wurde, mit mehreren Platten dieselben Ergebnisse erzielt. Es wurden von 16 verschiedenen Phosphoren 43 auswertbare Fluoreszenzaufnahmen gemacht.

b) Ergebnisse.

Haematoporphyrinfluoreszenz wurde aufgenommen in folgenden Grundmaterialien:

1. Gelatine (Deutsche Gelatinefabrik, Schweinfurt)
2. Kollodium
3. Borsäure
4. Saccharose
5. Maltose
6. Galaktose
7. Lävulose (Fa. Schering, Berlin, u. Merck, Darmstadt)
8. Mannose
9. Arabinose
10. Traubenzucker
11. Glykogen
12. Stärke
13. Albumen ovi
14. Prolin (Von Herrn Prof. Dr. D. Ackermann, Würzburg, zur Verfügung gestellt.)
15. Tyrosin
16. Cystin

Quantitative Unterschiede: Intensität:

Die Intensität der Haematoporphyrinfluoreszenz ist, wie die okulare Beobachtung ergab, in den einzelnen Grundmaterialien trotz gleicher Konzentration verschieden. Dies kommt bei den Fluoreszenzaufnahmen in den verschieden langen Belichtungszeiten zum Ausdruck. Nimmt man diese als Maßstab, dann kann man die aufgenommenen Phosphore hinsichtlich ihrer Intensität in drei Gruppen einteilen. Die in einer Gruppe angeführten Phosphore sind nach der jeweils von ihnen benötigten Belichtungszeit und damit nach ihrer Fluoreszenzintensität geordnet.

Gruppe 1. Sehr starke Fluoreszenz: Borsäure, Prolin, Stärke.

Gruppe 2. Starke Fluoreszenz: Gelatine, Kollodium, Zucker (Traubenzucker, Arabinose, Maltose, Galaktose, Mannose, Saccharose).

Gruppe 3. Schwache Fluoreszenz: Albumen ovi, Tyrosin, Cystin, Glykogen.

Dazu ist noch zu sagen, daß bei den Phosphoren der Gruppe 1 Borsäure weitaus die größte Fluoreszenzintensität aufweist. In großem Abstand folgen dann erst Prolin und Stärke, welche die doppelte Belichtungszeit von Borsäure erforderten. Die in Gruppe 2 angeführten Phosphore dürften alle ungefähr die gleiche Fluoreszenzintensität haben. Bei den Zuckern konnte ich feststellen, daß hinsichtlich der Fluoreszenzintensität doch Unterschiede vorhanden sind, indem Traubenzucker den besten und Saccharose den schlechtesten Haematoporphyrinzuckerphosphor liefert, während die andern Zuckerphosphore hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensitäten als gleichwertig zu betrachten sind. Bei den unter Gruppe 3 angeführten Phosphoren handelt es sich durchweg um Phosphore mit geringer Fluoreszenzintensität, welche alle sehr lange und ungefähr dieselben Belichtungszeiten erforderten; deshalb ist unsere Reihenfolge hier nicht für ihre Fluoreszenzintensität zu verwerten (s. Kap. IV c).

Zusammenfassend deckt sich, was die Haematoporphyrinfluoreszenzintensität in diesen Grundmaterialien betrifft, das Resultat unserer Durchsicht-Fluoreszenzaufnahmen mit den in Aufsicht durch okulare Fluoreszenzbeobachtungen gewonnenen Ergebnissen, bis auf einige Abweichungen bei den Phosphoren der dritten Gruppe. Hier handelt es sich aber ausnahmslos um Substanzen, bei denen sich die Phosphorschicht nicht so durchsichtig herstellen ließ wie bei den Grundmaterialien der beiden anderen Gruppen, sodaß hier sehr wahrscheinlich die mehr oder weniger starke Beeinträchtigung der Durchlässigkeit einen großen Einfluß auf die Intensität des zur Aufnahme gelangenden Fluoreszenzlichtes ausübte. Diese Störungen fielen natürlich bei der visuellen Fluoreszenzbeobachtung weg, da diese mit der Aufsichtmethode gemacht wurde. Bei der Fortführung unserer Versuche machten wir auch bei spektrographischen Fluoreszenzaufnahmen von der Aufsichtsmethode Gebrauch. Wir kommen mit kurzen Belichtungszeiten aus und sind in der Lage, auch sehr undurchsichtige Phosphore aufzunehmen.

Qualitative Unterschiede: Banden.

Das emittierte Fluoreszenzlicht ist in den einzelnen Grundmaterialien nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ verschieden. Was schon bei der okularen Betrachtung der Haematoporphyrinfluoreszenz in verschiedenem Einbettungsmaterial auffiel, daß nämlich auch die Natur des Fluoreszenzlichtes verschieden ist, konnte durch die zahlreich aufgenommenen Fluoreszenzspektren eindeutig festgelegt werden. Die qualitative Verschiedenheit des emittierten Fluoreszenzlichtes bei verschiedenen Grundmaterialien kommt zum Ausdruck in der Verschiedenheit der Fluoreszenzbanden hinsichtlich Anzahl, Lage und Intensität. Nach der Anzahl der Fluoreszenzbanden kann man die aufgenommenen Haematoporphyrinphosphore in 4 Gruppen einteilen; diese gruppenweise Zusammenfassung ver-

schiedener Grundmaterialien bleibt auch unter Berücksichtigung der anderen Aufnahmen erhalten, welche von den hier verwerteten Abweichungen ergaben, wie oben besprochen.

1. Gruppe: Haematoporphyrinphosphore, welche nur eine Fluoreszenzbande aufweisen: Tyrosin, Cystin, Glykogen.
2. Gruppe: Haematoporphyrinphosphore, welche 2 Fluoreszenzbanden aufweisen: Gelatine, Kollodium, Albumen ovi, Prolin.
3. Gruppe: Haematoporphyrinphosphore, welche 3 Fluoreszenzbanden aufweisen: Stärke, Traubenzucker, Arabinose, Maltose, Galaktose, Mannose, Saccharose.
4. Gruppe: Haematoporphyrinphosphore, welche 4 Fluoreszenzbanden aufweisen: Borsäure.

Zu den Fluoreszenzspektren der Stoffe aus der 1. Gruppe muß gesagt werden, daß hier zwar immer deutlich eine Bande festgestellt werden konnte, daß sich aber neben dieser deutlichen Bande noch ein diffuser Schwanz zeigte (s. Fig. 7). Obgleich derselbe Phosphor mehrmals mit verschieden langer Belichtungszeit aufgenommen wurde (bis zu 12 Stunden), in der Annahme, es könnte durch längere Belichtungszeit das angegebene diffuse Licht sich als eine weitere Fluoreszenzbande herausstellen, obwohl auch verschiedene Phosphore von dem gleichen Grundmaterial zur Aufnahme kamen, in der Annahme, es könnte vielleicht eine zufällige Oberflächenstruktur diesen Effekt bewirken, so konnte ich trotzdem bei diesen Substanzen nur eine deutliche Bande auf der Platte erhalten. Man kann aber vermuten, daß die Haematoporphyrinfluoreszenz in diesen Grundmaterialien auch noch eine bezw. zwei weitere Banden besitzt, die aber durch das Zusammentreffen von verschiedenen ungünstig wirkenden Umständen bei unseren Herstellungs- und Aufnahmebedingungen (z. B. schlechtere Durchsichtigkeit dieser Phosphore, geringere Intensität ihres Fluoreszenzlichtes) nicht wirksam werden konnte. Den Hauptgrund dieser Störung erblicke ich in der Tatsache, daß bei diesen Phosphoren im Phosphor zerstreut Stellen vorhanden sind, welche überhaupt kein Fluoreszenzlicht aussenden, sei es, daß das Haematoporphyrin nicht gleichmäßig verteilt ist, oder daß aus einem andern Grunde die vorhandene Haematoporphyrinfluoreszenz ausgelöscht wird. Theoretisch müßte ja Glykogen als ein Polysaccharid und nahe der Stärke verwandt, eigentlich drei Banden aufweisen. Ebenso wären bei den Aminosäuren Tyrosin und Cystin zwei Banden zu erwarten. Obige Vermutung erhält noch eine Stütze darin, daß der diffuse Schwanz an der Stelle liegt, an der die anderen Banden zu erwarten wären. Die Lage der bei diesen Phosphoren erhaltenen einen Fluoreszenzbande ist, wenn man die mittlere Genauigkeit berücksichtigt, immer die gleiche, es ist die

langwelligste Bande, während der Schwanz gegen das kurzwellige Ende liegt.

Daß die Haematoporphyrinfluoreszenz in den in der zweiten Gruppe angeführten Grundmaterialien deutlich nur aus zwei Fluoreszenzbanden besteht, ist durch wiederholte Aufnahme des gleichen Phosphors mit verschieden langer Belichtungszeit einwandfrei festgestellt worden. Die Lage der Banden ist auch bei allen Phosphoren dieser Gruppe unter Berücksichtigung der mittleren Genauigkeit immer die gleiche. Bei Gelatine, Albumen ovi und Prolin ist die langwelligere Bande etwas intensiver, während bei Kollodium die kurzwelligere Bande vielleicht die doppelte Intensität der langwelligeren Bande aufweist.

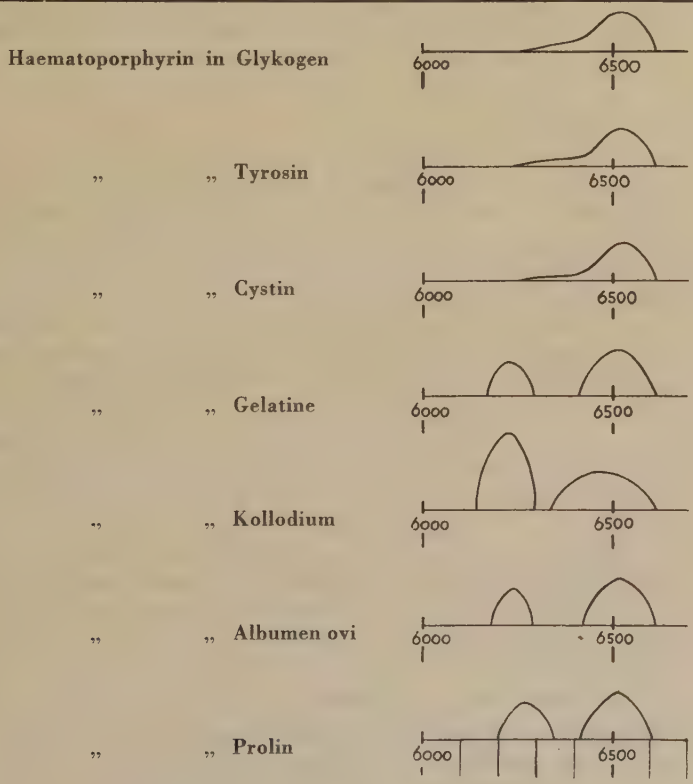


Fig. 7

Die Lage der Fluoreszenzbanden von Haematoporphyrinphosphoren mit verschiedenem Grundmaterial in schematischer Darstellung. Phosphore mit 1 und 2 Fluoreszenzbanden.

Während sich in der ersten und zweiten Gruppe chemisch sehr verschiedenartig gestaltete Stoffe befinden, wie z. B. Kollodium, Gelatine, Aminosäuren, gehören die Verbindungen, in denen die Haematoporphyrinfluoreszenz drei Banden aufweist, alle zur großen Gruppe der Saccharide. Es wurden aber mit Absicht nicht lauter analog aufgebaute Stoffe als Einbettungsmaterial gewählt, sondern Verbindungen, die verschiedenen Unterabteilungen angehören. So wurden Polysaccharide, Disaccharide und Monosaccharide, von letzteren sowohl Hexosen und Pentosen, als Medien verwendet. Die Fluoreszenzspektren von Haematoporphyrin zeigen aber in all diesen Stoffen drei Fluoreszenzbanden, welche, von geringen Abweichungen abgesehen, an der gleichen Stelle liegen. Die langwelligste Bande zeigt die größte Intensität. Von den beiden andern Banden ist die kurzwelligste noch etwas intensiver als die mittlere. Nur Galaktose macht eine Ausnahme insofern, als hier die Intensität der mittleren Bande größer ist, sodaß diese hinsichtlich Intensität zwischen der kurzwelligsten und der langwelligsten Bande steht (s. Fig. 8 u. Spektrogr. I).

Vier Fluoreszenzbanden zeigt Haematoporphyrin in der Borsäure (s. Fig. 8 u. Spektrogr. II). Im Gegensatz zu den Einbettungsmitteln der drei ersten Gruppen handelt es sich hier um ein anorganisches Medium. Nach dem, was über die Borsäurephosphore gesagt wurde (Kap. II b), ist es nicht verwunderlich, sondern zu erwarten, daß der Borsäurehaematoporphyrinphosphor eine große Anzahl von Fluoreszenzbanden besitzt, was man durch wiederholte Fluoreszenzaufnahmen von Borsäurephosphoren mit variierten Herstellungsbedingungen bei weiterer Plattensensibilisierung untersuchen müßte. Was die Lage der vier Borsäurefluoreszenzbanden betrifft, so muß festgestellt werden, daß alle Fluoreszenzbanden dieses Phosphors an ganz anderen Stellen liegen als bei den bis jetzt beschriebenen Fluoreszenzspektren. Die kurzwelligste und die langwelligste Bande sind nach langen Wellen verschoben, besonders letztere. Die beiden dazwischen liegenden Banden entsprechen ebenfalls keiner unserer bis jetzt beschriebenen Fluoreszenzbanden. Die Intensitätsverteilung unter den einzelnen Banden ist folgende: die kurzwelligste Bande ist die schwächste, es reiht sich nun an die ihr folgende Bande, nach welcher die langwelligste Bande kommt. Die zwischen den beiden letzteren liegende Bande ist die weitaus stärkste.

Eine für die Technik der Fluoreszenzaufnahme wichtige Tatsache folgte aus der oft ganz verschiedenen Intensität der Fluoreszenzbanden. Für die Platte wird die stärkere Bande bereits überexponiert sein, wenn die schwächeren Banden zu erscheinen beginnen; deshalb mußten wir manchmal ein und denselben Phosphor mit verschieden langen Belichtungszeiten aufnehmen, um einzelne Banden deutlich zu erhalten.

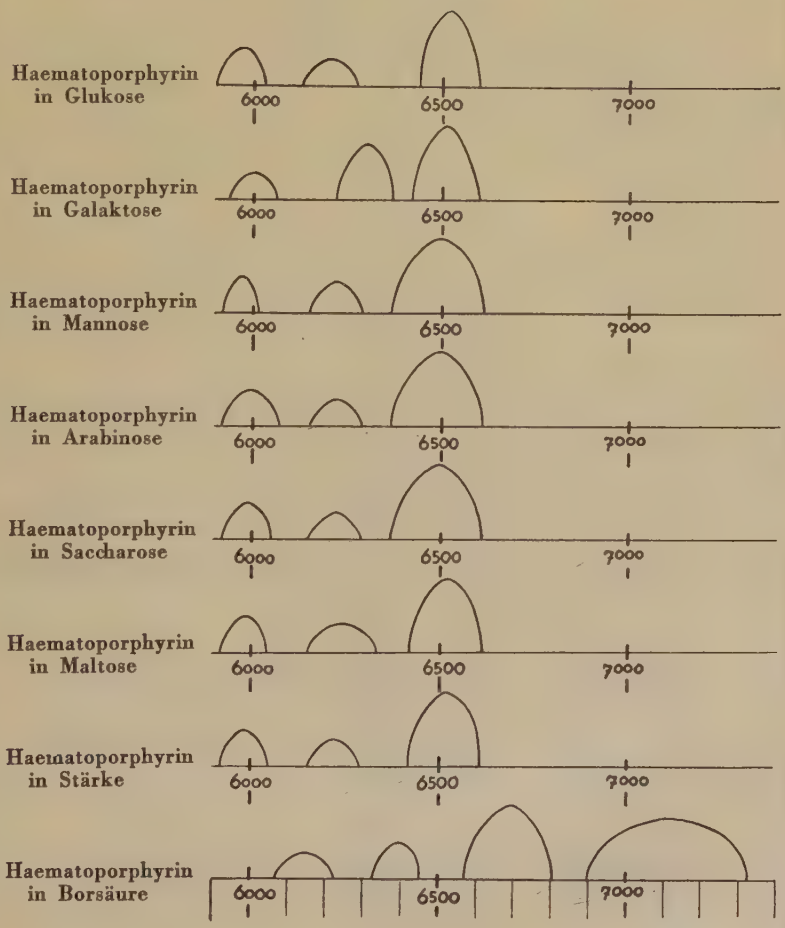


Fig. 8

Die Lage der Fluoreszenzbanden von Haematoporphyrinphosphoren mit verschiedenem Grundmaterial in schematischer Darstellung. Phosphore mit 3 und 4 Fluoreszenzbanden.

Die Auswertung der Fluoreszenzspektren geschah an Hand der Dispersionskurve. Die mittlere Genauigkeit betrug + 30 Å.

Beschreibung der Fluoreszenzspektren.

Aus der für jeden Phosphor gegebenen schematischen Zeichnung (s. Fig. 7 u. 8) ist die Lage und Anzahl der Banden, sowie die Intensitätsverteilung unter den einzelnen Banden zu ersehen.

I. Grundmaterialien mit einer Haematoporphyrinfluoreszenzbande:

1. Glykogen:	6420—6610
2. Tyrosin:	6430—6610
3. Cystin:	6440—6610

II. Grundmaterialien m. zwei Haematoporphyrinfluoreszenzbanden:

1. Gelatine:	6170—6290
	6410—6610
2. Kollodium:	6140—6290
	6340—6610
3. Albumen ovi:	6180—6290
	6420—6610
4. Prolin:	6200—6350
	6420—6610

III. Grundmaterialien mit drei Haematoporphyrinfluoreszenzbanden:

1. Traubenzucker:	5900—6030
	6130—6270
	6440—6600
2. Galaktose:	5940—6060
	6220—6370
	6420—6600
3. Mannose:	5920—6010
	6150—6290
	6370—6610
4. Arabinose:	5920—6070
	6150—6290
	6370—6610
5. Saccharose:	5920—6040
	6150—6290
	6370—6610
6. Maltose:	5920—6040
	6150—6330
	6420—6610
7. Stärke:	5920—6040
	6150—6290
	6420—6610

IV. Grundmaterialien mit vier Haematoporphyrinfluoreszenzbanden:

1. Borsäure:	6070—6220
	6330—6450
	6570—6800
	6900—7320

Daß die Struktur der erhaltenen Fluoreszenzbanden sicher eine feinere ist, nehmen auch wir nach den Ergebnissen einer weiteren Versuchsreihe an, da wir Anhaltspunkte dafür haben, daß die großen Fluoreszenzbanden sich in schmale Teilbanden auflösen, die allerdings nur durch Photometrierung zu erfassen sind.

Für das Fluoreszenzspektrum von Haematoporphyrin in Lösung hat Rafalowski (41) 5 Einzelbanden festgestellt, und für das Fluoreszenzspektrum von Aetioporphyrin in Lösung haben Aharoni und Dhéré (47) bereits 15 Einzelbanden ermittelt.

Im Folgenden bringen wir Ergebnisse einer weiteren in sich geschlossenen Versuchsreihe, bei der vor allem der Einfluß des Lösungsmittels (Essigsäure, Alkohol) sowie der Unterschied zwischen der Fluoreszenz von Haematoporphyrin und Aetioporphyrin in gleichen Grundmaterialien untersucht wurde. In dieser Versuchsreihe wurden nur einige ausgewählte Grundstoffe mit lichtstarker Fluoreszenz untersucht. Die Ergebnisse sind Seite 35 besprochen (s. Fig. 6 u. Spektrogramme II).

Lösungen:

Haematoporphyrin in Alkohol:	6160—6280
	6510—6590
	6610—6730
Haematoporphyrin in Essigsäure:	5980—6070
	6210—6310
	6510—6590
	6610—6730
Aetioporphyrin in Essigsäure:	5920—5950
	5950—6040
	6450—6590
	6610—6730

Phosphore:

Haematoporphyrin alkoh. in Gelatine:	6110—6250
	6450—6560
	6610—6730
Haematoporphyrin essigs. in Gelatine:	6160—6250
	6450—6560
	6630—6730

Aetioporphyrin essigs. in Gelatine:	6110—6250
	6450—6560
	6610—6750
Haematoporphyrin alkoh. in Stärke:	5980—6070
	6160—6250
	6450—6560
	6590—6730
Haematoporphyrin essigs. in Stärke:	5980—6070
	6160—6250
	6450—6560
	6610—6730
Aetioporphyrin essigs. in Stärke:	5980—6040
	6450—6560
	6590—6730

Bei dieser zweiten Versuchsreihe wurden ebenfalls Agfa-Superpanplatten verwendet (Emulsionsnummer F 1083 und F 1106) und mit Metol-Hydrochinonentwickler entwickelt. Es wurden von 20 verschiedenen Phosphoren 23 auswertbare Fluoreszenzaufnahmen gemacht.

c) Arbeitshypothese.

Zum Schluß unserer Bemerkungen sei hier noch eine Arbeitshypothese angegeben, die wir uns nach den bisherigen Fluoreszenz- und Absorptionsaufnahmen gebildet haben, deren eingehende Begründung aber weiteren Versuchen vorbehalten werden muß.

Das Absorptionsspektrum unserer Haematoporphyrinphosphore zeigt zwei Typen entsprechend dem sauren und neutralen Typ von Haematoporphyrinlösungen. In den organischen Grundmaterialien mit dem sauren Absorptionsspektrum (Saccharide) findet sich auch ein Fluoreszenzspektrum, welches dem in sauren Lösungen weitgehend gleicht. Entsprechendes gilt für die Grundmaterialien mit dem neutralen Absorptionsspektrum. Das Grundmaterial hat innerhalb einer Gruppe im einzelnen einen gewissen Einfluß auf die Intensitätsverteilung der Banden, einen geringeren auf deren Lage. Borsäure nimmt eine Sonderstellung ein, die nicht in dieses Schema paßt. (Vergl. III 2.) Der Einfluß des Haematoporphyrinlösungsmittels ist von sekundärer Bedeutung.

4. Spektrographische Phosphoreszenzuntersuchung.

Es wurde der Spalt Sp eines lichtstarken Spektrographen mit Flüssigkeitsprisma[11] (Flüssigkeit: Zimmtäthyl, Prismenwinkel = 65°.

[11] Einen Spektrographen dieser Art benutzten A. C. S. van Heel und G. H. Visser zur Aufnahme von Emissionsspektren; Zeitschr. f. Phys. 70, 608, 1931.

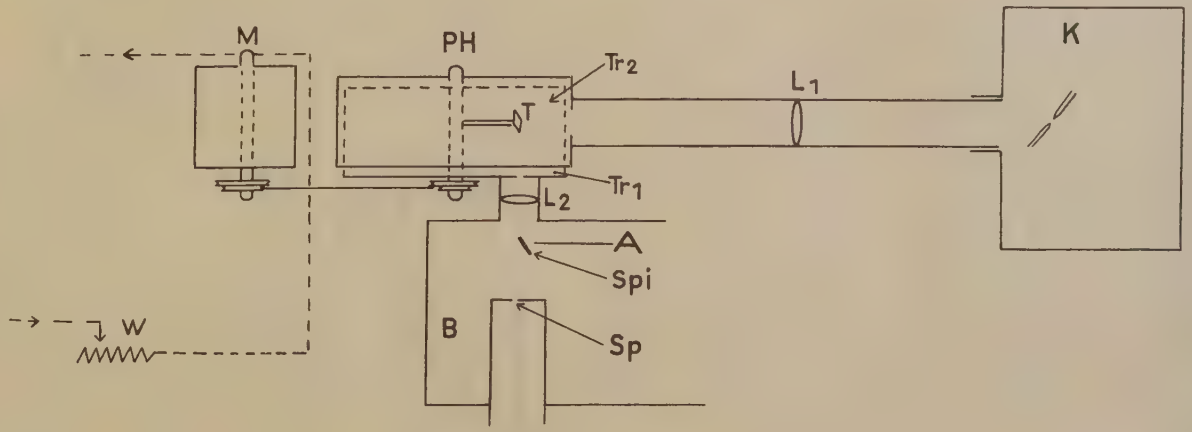


Fig. 9

Versuchsanordnung zu den spektrographischen Phosphoreszenzaufnahmen.

A = Auge des Beobachters, B = Beobachtungsgehäuse, Spi = auswechselbares Spiegelchen, Sp = Spalt des Spektrographen mit Flüssigkeitsprisma, L_1 u. L_2 = Sammellinsen, K = Kohlenbogenlampe, PH = Phosphoroskop, Tr_1 = rotierende Trommel, Tr_2 = feststehende Trommel, T = Tischchen mit Phosphor, M = Elektromotor, W = Schiebewiderstand.

Brennweite des Kameraobjektivs 118 mm, Öffnungsverhältnis 1:1,8) auf den zu untersuchenden Haematoporphyrinphosphor eingestellt, welcher sich auf dem Tischchen T des in Kap. IV 2 beschriebenen Phosphoroskops PH befand. Als erregende Lichtquelle diente eine große Kohlenbogenlampe K (Stromstärke: 20 Amp.; Kohlen: Conradty normalaktiv 4002), da diese, wie in Kap. III 3 besprochen, gute Haematoporphyrinphosphoreszenz zu erregen imstande ist. Das Licht dieser Lampe wurde mit einer Glaslinse L_1 auf das Phosphortischchen zentriert. Das vom Haematoporphyrinphosphor emittierte Phosphoreszenzlicht wurde gleichfalls mit einer Glaslinse auf den Spalt gesammelt, wobei in den Strahlengang des Phosphoreszenzlichtes in einem Winkel von 45° ein auswechselbares Spiegelchen angebracht war, wodurch die Phosphoreszenzintensität kontrolliert werden konnte, ohne eine Änderung der Einstellung vorzunehmen (s. Fig. 9).

Es gelangten nur solche Phosphore zur Aufnahme, die bei okularer Beobachtung gutes Nachleuchten zeigten. Trotz Belichtungszeiten bis zu 10 Stunden und Verwendung von übersensibilisierten Platten[12] ist es uns aber nicht gelungen, bei Zimmertemperatur Haematoporphyrinphosphoreszenz aufzunehmen.

[12] Nach einer uns freundlicherweise von der Firma mitgeteilten Übersensibilisierungsvorschrift wurden Agfa-Superpanplatten (Emulsionsnummer F 1151) nach einem Bad in Methanol zur Entfernung der Lichthofschutzschicht in einer wäßrigen Lösung von Soda und Ammoniak (5 g Soda, 5 ccm konz. Ammoniak, 1000 aqua dest.) übersensibilisiert und anschließend schnell getrocknet.

V. Zusammenfassung der Ergebnisse.

Haematoporphyrin (und Aetioporphyrin) zeigen bei Einbettung in sehr verschiedenartige organische und anorganische Grundmaterialien Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Das Momentan- und Dauerleuchten dieser Phosphore ist in den verschiedenen Medien hinsichtlich Intensität und Farbe verschieden, wobei die Farbe zwischen Gelbrot und Tiefrot schwankt (Fluoreszenzwechsel). Spektrographische Aufnahmen der Fluoreszenz bestätigen die okularen Untersuchungsergebnisse und ließen deutliche Unterschiede in der Emission der verschiedenen Grundstoffe hervortreten. Nach dem Grundmaterial kann man die Porphyrinfluoreszenz in verschiedene Gruppen einteilen. Von den organischen Grundstoffen bilden die Saccharide deutlich eine Gruppe, ebenso Aminosäuren und Eiweißsubstanzen. Das anorganische Medium Borsäure mit seinem differenzierten Fluoreszenzspektrum stellt ebenfalls einen besonderen Typ des Porphyrinfluoreszenzlichtes dar.

Von besonderer Bedeutung ist die Feststellung von beträchtlichen Unterschieden zwischen den verschiedenen Porphyrinphosphoren hinsichtlich ihrer Lumineszenzintensität (Fluoreszenz und Phosphoreszenz) und ihrer Haltbarkeit. Es ergibt sich, daß die Medien Borsäure und Prolin die stärkste Lumineszenzintensität aufweisen, daß aber die Gelatineporphyrinphosphore bei guter Lumineszenzintensität sich gleichzeitig durch eine lange Dauer der Lumineszenzfähigkeit auszeichnen und somit als die optimalen Porphyrinphosphore anzusprechen sind.

Die Abklingungsdauer des Phosphoreszenzlichtes wurde bei einer Reihe von Porphyrinphosphoren gemessen und Unterschiede von $^1/_{100}$ Sek. bis 1 Sek. festgestellt.

Praktisch wichtig ist die Feststellung, daß die Strahlen der Quecksilberdampflampe wohl zur Erregung der Fluoreszenz, aber nicht zur Erregung der Phosphoreszenz bei diesen Phosphoren geeignet sind. Eine genauere Festlegung der Erregungsverteilung der Phosphoreszenz durch Filterung des erregenden Lichtes zeigt, daß die Erregungsverteilung für Fluoreszenz und Phosphoreszenz dieser Phosphore verschieden ist.

Literatur.

1. Stokes: Phil. Trans. II. 403, 1852.

2. E. Becquerel: La lumière, ses causes et ses effets. Paris, 1867.

3. E. Wiedemann: Wied. Ann. 34, 448, 1888.

4. G. C. Schmidt: Wied. Ann. 58, 103, 1896.

5. R. W. Wood: Proc. Roy. Soc. 99, 362, 1921.

6. J. Dewar: Proc. Chem. Soc. 10, 171. Chem. News 70, 252, 1894.

7. J. v. Kowalski: Untersuchung über Phosphoreszenz organ. Verbindungen bei tiefer Temperatur. Physik. ZS. 12, 956, 1911. — Verh. d. D. Phys. Ges. 13, 952, 1911.

8. E. Tiede und A. Ragoß: Die Borsäurephosphore. Ber. d. D. chem. Ges. 54, 655, 1923.
und P. Wulff: Bortrioxydhydrate als Bestandteil hochphosphoreszenzfähiger, organischer Verbindungen enthaltender Systeme. — Ber. d. D. chem. Ges. 55, 588, 1922.

9. H. Kauffmann: Methoden zur Untersuchung von Fluoreszenzerscheinungen. Abderhalden, Hdb. d. biolog. Arbeitsmeth. II, 1, 131, 1921.

10. F. Perrin: Rôle de la viscosité dans les phénomènes de fluorescence. Compt. rend. Acad. Sc. Paris, 178, 2252, 1924; 178, 1978, 1924.

11. S. J. Wawilow: Die Fluoreszenzausbeute von Farbstofflösungen. ZS. f. Phys. 22, 266, 1924.
Die Auslöschung der Fluoreszenz von Farbstofflösungen bei großer Konzentration. ZS. f. Phys. 31, 750, 1925.
und W. L. Lewschin: Die Beziehungen zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz in festen und flüssigen Medien. — ZS. f. Phys. 35, 920, 1926.
und W. L. Lewschin: ZS. f. Phys. 16, 185, 1923.

12. W. L. Lewschin: Die Auslöschung der Fluoreszenz in festen und flüssigen Farbstofflösungen. — ZS. f. Phys. 43, 230, 1927.

13. A. W. Banow: Über die Auslöschung der Fluoreszenz flüssiger Farbstofflösungen durch Elektrolyte. — ZS. f. Phys. 64, 121, 1930.

14. J. Stark: Prinzipien der Atomdynamik. Leipzig, 1915.

15. G. C. Schmidt: Über die Lumineszenz von festen Lösungen. — Ann. d. Phys. 65, 247, 1921.

16. P. Pringsheim und S. J. Wawilow: Polarisierte und unpolarisierte Phosphoreszenz fester Farbstofflösungen. — ZS. f. Phys. 37, 705, 1926.

17. A. Carelli und P. Pringsheim: Über die Photolumineszenz von Farbstoffen in zähen Lösungsmitteln. — ZS. f. Phys. 18, 317, 1923.

18. H. Kautsky und H. de Bruijn: Die Aufklärung der Photolumineszenztilgung fluoreszierender Systeme durch Sauerstoff. — Die Naturwiss. 19, 1043, 1931.

A. Hirsch, W. Baumeister: Photolumineszenz fluoreszierender Farbstoffe an Grenzflächen. — Ber. d. D. chem. Ges. 64, 2053, 1931.

und A. Hirsch: Phosphoreszenz adsorbierter fluoreszierender Farbstoffe und ihre Beziehung zu reversiblen und irreversiblen Strukturänderungen der Gele. — Ber. d. D. chem. Ges. 65, 401, 1932.

19. P. Borissow: Journ. d. russ. chem. Ges. 37, 249, 1905.

20. E. Goldstein: Über diskontinuierliche Leuchtspektra fester organischer Körper. — Verh. d. D. phys. Ges. 6, 156, 1904.

Über die Emissionsspektra aromatischer Verbindungen. — Verh. d. D. phys. Ges. 6, 185, 1904.

Über einen besonderen Typus diskontinuierlicher Emismissionsspektra fester Körper. — Verh. d. D. phys. Ges. 12, 376, 1910.

21. A. Schleede: Über das Phosphoreszenzzentrum. — ZS. f. Phys. 18, 109, 1923.

22. F. Hoppe-Seyler: ZS. f. physiolog. Chemie 4, 193, 1880.

23. E. Schunk und L. Marchlewski: Zur Chemie des Chlorophylls. — Liebigs Ann. d. Chem. 290, 306, 1896.

24. W. Hausmann: Die sensibilisierende Wirkung des Haematoporphyrins. — Biochem. ZS. 30, 276, 1911.

Über die sensibilisierende Wirkung des Haematoporphyrins. Strahlentherapie 3, 112, 1913.

25. Ch. Dhéré und S. Sobolewski: Sur quelques propriétés de l'hématoporphyrine. Compt. rend. Soc. de Biol. I, 1911.

S. Schneider, Th. van der Bom: Détermination photographique des spektres de fluorescence de l'hématoporphyrine dans divers solvents. — Compt. rend. Acad. des Sc. 179, 351, 1924.

et E. Bois: Étude comparative de la fluorescence de quelques porphyrines naturelles et artificielles. — Compt. rend. Acad. des Sc. 183, 1926.

26. R. Heller: Die Fluoreszenz der Haemoglobinderivate und ihre Bedeutung für den forensischen Blutnachweis. — Vierteljahresschr. f. Gerichtl. Med. 51, 222, 1916.

27. R. Golonsko: Die Bedeutung der Fluoreszenzerscheinungen für Spurenuntersuchungen in der gerichtlichen Medizin. — Thèse de Zürich 1916.

28. H. Langecker: Zur Fluoreszenzbeobachtung bei den Porphyrinen. — ZS. f. physiol. Chem. 115, 1, 1921.

29. J. Enneking: Quantitative Fluoreszenzanalyse mittels kolorimetrischer, nephelometrischer und photometrischer Meßmethoden. — Diss. Hannover 1930.

30. R. Fikentscher: Quantitative Porphyrinbestimmung durch Lumineszenzintensitätsmessung mit dem Stufenphotometer. — Biochem. ZS. 249, 257, 1932.

31. H. Fink: Über die Koproporphyrie der Hefe. — Biochem. ZS. 211, 65, 1929.

Porphyrinfluoreszenz und Wasserstoffzahl. — Die Naturwissensch. 18, 16, 1930.

und W. Hoerburger: Über die Ochronose der Schlachttiere II. Isolierung von Uroporphyrin aus den Knochen. Identitätsbeweis mit Hilfe der PH-Fluoreszenzkurven und durch Analyse. — ZS. f. physiol. Chem. 202, 8, 1931.

32. H. Kämmerer: Über die klinische Bedeutung der Porphyrine. — Klinische Wschr. 1930.

33. H. Th. Schreus und C. Carrie: Beitrag zur Methode des Porphyrinnachweises im Harn. — Klin. Wschr. 1931, 1017.

Weitere Mitteilung zur quantitativen Porphyrinbestimmung im Harn. — Klin. Wschr. 1933, 146.

34. A. Hijmans v. d. Bergh und W. Grotepaß: Porphyrinämie ohne Porphyrinurie. Klin. Wschr. 1933, 586.

35. O. Schumm: Über Haematoporphyrine und Haematoporphyrie. — Klin. Wschr. 1926, 1574.

Einzelarbeiten in ZS. f. physiol. Chem.

36. Th. van der Bom: Recherches sur la fluorescence de l'hématoporphyrine. — Fribourg, 1924.

37. H. Hellström: Beziehungen zwischen Konstitution und Spektren der Porphyrine. — ZS. f. physikal. Chem. B. 12, 353, 1931.

Zit. nach Physikal. Ber. 15, 905, 1934.

38. E. Bois: Recherches spektrochimiques sur quelques porphyrines animales. — Fribourg, 1927.

39. E. Derrien und J. Turchini: Über die rote Fluoreszenz verschiedener tierischer Gewebe und Sekrete im U.V. Licht. — Compt. rend. des seanc. de l'acad. Biol. 92, 1030, 1925.

und Ch. Benoit: Notes et observations sur les urines et quelques organes d'une femme morte en crise de Porphyrie aigue. — Arch. d. l. soc. des sciences medic. et biolog. de Montpellier, 8, 458, 1929.

40. M. Borst und H. Königsdörffer: Untersuchungen über Porphyrie unter besonderer Berücksichtigung der Porphyria congenita. — Hirzel, Leipzig 1929.

41. S. Rafalowski: Über dauernde Veränderungen bei der Fluoreszenz des Haematoporphyrins. — ZS. f. Phys. 71, 798, 1931.

42. A. Treibs: Molekülverbindungen der Porphyrine. — Ann. Chem.-Pharm. (Liebig) 476, 1.

43. H. Fischer und A. Schornmüller: Synthese dreier Pyrroporphyrine, eines Rhodoporphyrins, Pyrro-Aetioporphyrins sowie Deuteroporphyrins. — Ann. Chem. Pharm. (Liebig) 473, 211.

44. K. S. Frese: Spektrochemische Untersuchungen an Haematoporphyrin und seinen Verbindungen. — Diss. Würzburg 1932.

45. G. Heyne und M. Pirani: Eine spektrographische Methode zur Feststellung der Lumineszenzerregung. — ZS. f. techn. Phys. 1933, 31.

46. V. Henri und R. Wurmser: Le mécanisme élémentaire des actions photochimiques. — Journ. de Phys. et le Radium (6) 3, 181, 1922.

47. Aharoni und Dhéré: Étude de l'influence exercée par la longueur d'onde des rayons excitateurs sur le spektre de fluorescence de l'étioporphyrine. Structure de ce spektre depuis l'extrême rouge (infrarouge) jusqu' à l'ultraviolet. — Compt. rend. Acad. des. Sc. 190, 1499, 1930.

Außerdem wurden als zusammenfassende Werke benutzt:

48. P. Lenard, F. Schmidt, R. Tomascheck: Handbuch der Experimentalphysik. Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Bd. XXIII, 1. und 2. — Leipzig, 1928.

49. P. Pringsheim: Fluoreszenz und Phosphoreszenz im Lichte der neueren Atomtheorie. — Julius Springer, 1928.

50. O. Schumm: Spektrochemische Analyse natürlicher organischer Farbstoffe. — Fischer, Jena, 1927.

51. H. Fischer: Farbstoffe mit Pyrrolkernen. — Handb. d. Biochem. Oppenheimer, Ergänz.-Band. Fischer, Jena, 1930.

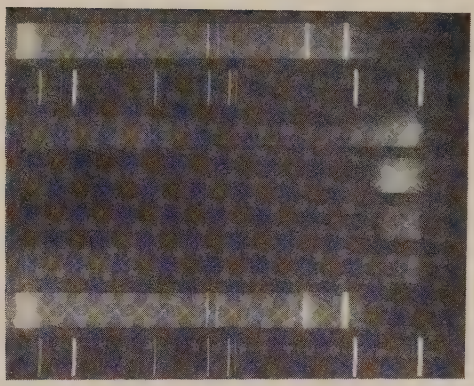
52. E. Abderhalden: Aminosäuren und ihre Derivate. — Handb. d. Biochemie, Oppenheimer, I. 159. Fischer, Jena, 1924.

53. Ch. Dhéré: Nachweis der biologisch wichtigen Körper durch Fluoreszenz und Fluoreszenzspektren. — Abderhalden, Handb. d. biolog. Arbeitsmeth. II, 3, 3097, 1933.

Lebenslauf.

Am 3. März 1908 wurde ich in Kaiserslautern als Sohn des Polizeibeamten Anton Klaus und seiner Ehefrau Hedwig geb. Bumb geboren. Ich besuchte von 1919 bis 1922 das humanistische Gymnasium in Kaiserslautern, anschließend das Wilhelmsgymnasium in München, wo ich am 27. März 1928 das Zeugnis der Reife erhielt. Ich studierte Medizin an den Universitäten Würzburg, Rostock und München. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im Sommer 1930 in Rostock, das medizinische Staatsexamen im Januar 1934 in Würzburg. Anschließend war ich an den Medizinischen Universitätskliniken Gießen und Freiburg i. Br. tätig.

Fluoreszenzspektrogramme I.



Hg

He

Haematop. alkoh. in Kollodium Phosphor

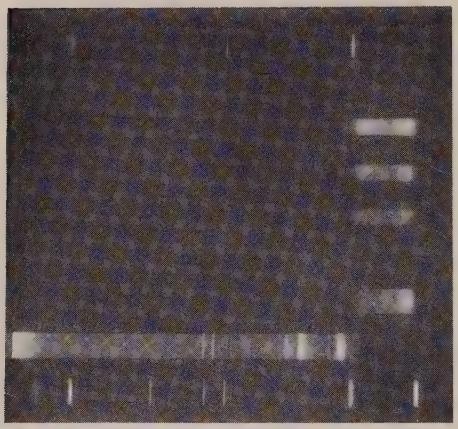
Haematop. essigs. in Kollodium

Haematop. Nordm. Lös. in Gelatine

Haematop. Nordm. Lös. in Cystin

Hg

He



He

Haematop. in 30 %-Traubenzuckerlösung

desgl.

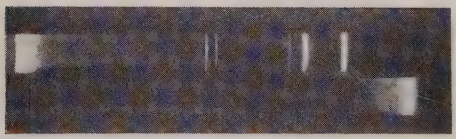
desgl.

Stärke ohne Haematop.

Haematop. in essigs. Stärke

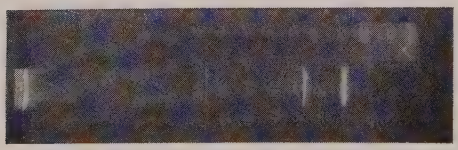
Hg

He



Hg

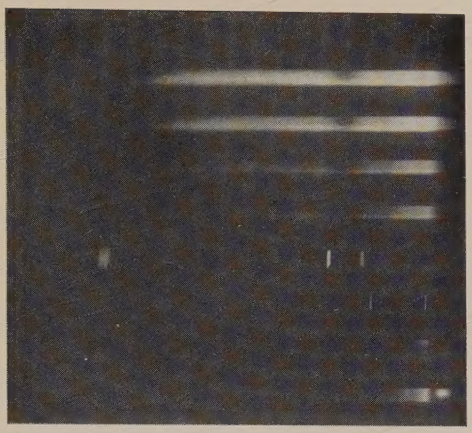
Haematop. Nordm. Lös. in Galaktose



Haematop. Nordm. Lös. in Maltose

Hg

Fluoreszenzspektrogramme II.



Absorption d. Haematop. Borsäure-Phosphors mit verschieden. Belichtungszeiten

desgl.

desgl.

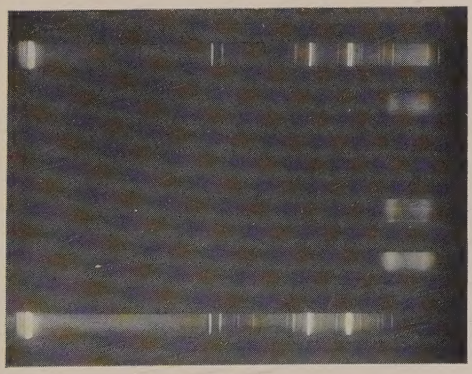
desgl.

Hg

He

Haematop. Nordm. Lös. in Borsäure

desgl.



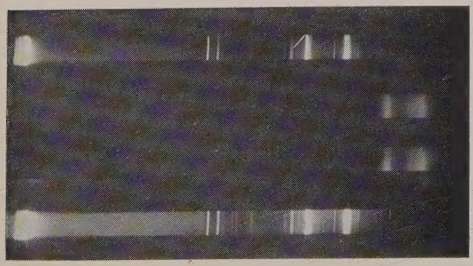
Hg

Haematop. alkoh. in Gelatine

Haematop. essigs. Gelatine

desgl.

Hg



Hg

Aetioporphyrin essigs. in Gelatine

desgl.